



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS DE UN FÁRMACO
MODELO *IN SITU* A TRAVÉS DE UN SISTEMA AUTOMICROEMULSIONABLE
SMEDDS PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

DOCTOR DAVID QUINTANAR GUERRERO
FES CUAUTITLÁN UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS DE UN
FÁRMACO MODELO *IN SITU* A TRAVÉS DE UN SISTEMA
AUTOMICROEMULSIONABLE SMEDDS PARA LA
ADMINISTRACIÓN ORAL**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FES CUAUTITLÁN UNAM**



Ciudad de México, Enero 2018



AGRADECIMIENTOS OFICIALES

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
AL PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, UNAM.
A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN CAMPO 1
AL DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO POR SU GUÍA Y APOYO
AL CONACYT POR LA BECA OTORGADA 227113
A LA DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS Y AL DR. FRANCISCO
HERNÁNDEZ LUIS POR SU APOYO COMO INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR.
A LOS DOCTORES SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS, LUZ MARÍA MELGOZA
CONTRERAS, EMILIO BUCIO CARRILLO, ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO Y ANNA
KÓZINA POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS.



DEDICATORIA

A mis padres Carlos Llera y Ma. del Pilar Rojas, mi hermano Roberto Llera y a mi esposo Cuauhtémoc López por todo su amor, apoyo y confianza, sin ellos no podría haber llegado hasta aquí.

Al doctor David Quintanar, por ser mi guía durante todo este camino. Gracias por transmitirme sus conocimientos, su paciencia y apoyo invaluable.

A mis amigos, Irene Aguilar, Verónica Zamora, Andrea Majluf, Marcos Ortega, Angélica Villanueva, Citlalli, Perla Castañeda, Zaida Urbán, Aarón García, Adriana López, Elsa Cruz, Mauricio Hernández, Diana Contreras, Diana Tiburcio, Ameyalli Fonte, Anahí Nicolás, Tere Pineda, Vanessa Vélez, María José Rivero, Daniel Vega, Gabriela Álvarez, Mariana, Guillermo García, Alberto Lima, Bengie García, por compartir esas horas de laboratorio, enriquecer mi mente con sus inquietudes, gracias por crecer conmigo y hacer más ameno el camino.



PRESENTACIÓN

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, FES Cuautitlán C-1, bajo la tutoría del Dr. David Quintanar Guerrero; el comité tutor estuvo conformado por la Dra. Luz María Melgoza y el Dr. Francisco Hernández Luis.

Como productos destacan:

El Poster Award de la APGI 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery. Trabajo: A novel *in situ* Nanocapsule based SMEDDS formulation. (Pisa, Italia Septiembre 2013).

2o Lugar en la modalidad de presentación oral. QUIMIUNAM, Programa de Posgrado en Ciencias Químicas UNAM con el trabajo “Desarrollo de sistemas autoemulsificables formadores de nanocápsulas *in situ*” (México D.F. Abril de 2015).

El artículo indizado JCR:

Llera-Rojas V.G., Del Real L. A., Mendoza-Muñoz N., Melgoza-Contreras L.M., Quintanar-Guerrero D. Feasibility of obtaining *in situ* nanocapsules through modified self-microemulsifying drug delivery systems. A new manufacturing approach for oral route administration. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Feb 8:1-7. doi: 10.1080/03639045.2017.1285308.



RESUMEN

Las nanocápsulas son partículas submicrónicas coloidales con una estructura de tipo reservorio capaces de incrementar la eficacia de diversos fármacos, además de evitar su degradación y proporcionar una liberación modificada. A pesar de estas ventajas, existen pocos métodos para la fabricación de NC's y todas las metodologías requieren de pasos de recuperación y purificación que incrementan el costo de producción y pueden causar la pérdida de la estructura y funcionalidad de las nanocápsulas.

Estas desventajas hacen necesaria la búsqueda de nuevas metodologías para la obtención de nanocápsulas, por lo que el objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo de una nueva metodología capaz de permitir la obtención de nanocápsulas *in situ*, este enfoque permite evitar los pasos de recuperación preservando la estructura y funcionalidad de estos sistemas hasta su administración. El método propuesto está basado en los sistemas automicroemulsificables (SMEDDS por sus siglas en inglés). La técnica resultante es sencilla, rápida, económica. Las nanocápsulas así obtenidas están constituidas por una membrana de copolímero de metil metacrilato y un núcleo triglicérido cáprico/ caprílico, poseen una estructura externa esférica, un tamaño de partícula de 126.6 ± 40.9 nm, una eficiencia de encapsulación del 31.3 % (utilizando el fármaco modelo ibuprofeno) y un potencial Z de 37.4 mV. La densidad de las nanopartículas y su perfil de liberación, permiten proponer que se obtuvieron sistemas de tipo vesicular.



ABSTRACT

Nanocapsules are submicronic colloidal particles with a reservoir-like structure capable of enhancing the efficacy of many drugs, in addition they can't prevent drug degradation and provide a controlled release. Despite these advantages, there are few methods for the manufacture of nanocapsules and all methodologies require recovery and purification steps that increase the cost of production and can cause the loss of the structure and functionality of the nanocapsules.

These disadvantages make it necessary to search for new methodologies to obtain nanocapsules, so the objective of this work was to develop a new methodology capable of obtaining nanocapsules *in situ*, this approach allows to avoid recovery steps preserving the structure and functionality of these systems until their administration. The proposed method is based on self-emulsifying systems (SMEDDS). The resulting technique is simple, fast, economical and requires no further purification steps. The nanocapsules thus obtained are constituted by a methyl methacrylate copolymer membrane and a caprylic / caprylic triglyceride core, have a spherical outer structure, a particle size of 126.6 ± 40.9 nm, an encapsulation efficiency of 31.3 % (using the model drug Ibuprofen) and a Z potential of 37.4 mV. The density of the nanoparticles and their release profile, allow to propose that vesicular type systems were obtained.



CONTENIDO

Presentación.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Contenido.....	6
Abreviaturas.....	9
Definiciones.....	10
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Índice de anexos.....	14
1. Introducción.....	15
2. Antecedentes.....	19
2.1 Nanopartículas Farmacéuticas.....	19
2.2 Nanopartículas poliméricas.....	21
2.3 Métodos de fabricación de nanopartículas poliméricas.....	23
2.4 Self Microemulsifying Drug Delivery Systems SMEDDS.....	26
2.5 Obtención de nanopartículas in situ utilizando SMEDDS.....	27
2.6 Fármaco modelo, ibuprofeno.....	31
2.6.1 Generalidades.....	31
2.6.2 Propiedades fisicoquímicas.....	32
2.7 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	37
2.7.1 Métodos de muestreo y separación (MS).....	38
2.7.2 Métodos de flujo continuo (FC).....	39
2.7.3 Métodos de diálisis.....	40
2.8 Modelos matemáticos de liberación.....	41
2.8.1 Modelo cinético de orden cero.....	41
2.8.2 Modelo cinético de orden uno.....	42
2.8.3 Modelo de Higuchi.....	45
2.8.4 Modelo de Korsmeyer - Peppas.....	45



2.9	Estimación del tamaño de partícula.....	48
2.10	Determinación del potencial Z.....	50
3.	Hipótesis.....	55
4.	Justificación.....	56
5.	Objetivos.....	57
6.	Metodología.....	59
6.1	Fabricación de las nanopartículas.....	60
6.1.1	Solubilidad del fármaco modelo en la fase oleosa.....	60
6.1.2	Obtención de las nanocápsulas.....	61
6.1.3	Obtención de nanoesferas.....	62
6.2	Caracterización de las Nanopartículas.....	64
6.2.1	Tamaño de partícula.....	64
6.2.2	Potencial Z.....	64
6.2.3	Morfología.....	65
6.2.4	Densidad.....	65
6.3	Eficiencia de encapsulación.....	66
6.3.1	Selección del método analítico.....	66
6.3.2	Validación parcial del método analítico.....	66
6.3.3	Eficiencia de encapsulación.....	68
6.4	Estudios de liberación.....	69
6.4.1.	Selección de la metodología.....	69
6.4.2.	Evaluación de la membrana de diálisis y estudio de liberación.....	71
7.	Resultados y discusión.....	73
7.1	Fabricación de las nanopartículas.....	73
7.1.1	Solubilidad del fármaco modelo en la fase oleosa.....	73
7.2.	Caracterización de las Nanopartículas.....	74
7.2.1	Tamaño de partícula.....	74
7.2.2	Potencial Z.....	75
7.2.3	Morfología.....	77
7.2.4	Densidad.....	79
7.3.	Eficiencia de encapsulación.....	82



7.3.1	Selección de método analítico.....	82
7.3.2	Evaluación del método analítico.....	82
7.3.3	Eficiencia de encapsulación.....	88
7.4	Estudios de liberación.....	89
7.4.1	Selección de la metodología.....	89
7.4.2	Evaluación de la membrana de diálisis y estudio de liberación.....	90
8.	Conclusiones.....	96
9.	Perspectivas.....	97
10.	Bibliografía.....	98
11.	Anexos.....	108
	Anexo 1 Propiedades del Copolímero de metilmetacrilato.....	108
	Anexo 2 Propiedades del triglicérido de cadena media.....	110
	Anexo 3 Propiedades del aceite de ricino polioxil hidrogenado.....	113
	Anexo 4 Espectros de absorción UV del ibuprofeno.....	116
	Anexo 5 Artículo.....	117



ABREVIATURAS

FC	Flujo continuo
Ibp	Ibuprofeno
MS	Muestreo y separación
NC	Nanocápsula
NC's	Nanocápsulas
NE	Nanoesfera
NE's	Nanoesferas
NP	Nanopartícula
NP's	Nanopartículas
PMNL	Peso molecular nominal límite
R ²	Coefficiente de correlación
SMEDDS	Self microemulsifying drug delivery systems (Sistema automicroemulsificables)



DEFINICIONES

Acarreador farmacéutico	Sistema diseñado para la dosificación de un fármaco.
Condiciones sink	Cuando el volumen de disolución del medio es de 5 a 10 veces más grande que el volumen requerido de saturación.
Acarreador	Sistema diseñado para la entrega de fármacos.
pKa	Es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil.
Log P	Coefficiente de reparto.
Nanopartículas farmacéuticas	Partículas sólidas coloidales cuyo tamaño varía entre 100 nm a 1000 nm, constituidas por materiales macromoleculares en donde el principio activo puede estar disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o ligado.
Nanocápsulas	Acarreadores farmacéuticos con una estructura de tipo reservorio.
Nanoesferas	Acarreadores farmacéuticos con una estructura de tipo matricial.
Sistema de liberación convencional	Sistemas diseñados para comenzar a liberar el principio activo una vez que entran en contacto con el cuerpo.
Sistema matricial	En este tipo de sistemas el fármaco se encuentra homogéneamente disperso en el acarreador
Sistema reservorio	Son sistemas conformados por un núcleo, usualmente oleoso, que se encuentra rodeado por una membrana.
SMEDDS	Mezclas de tres componentes, tensoactivo, cotensoactivo y aceite que en dispersión acuosa pueden formar microemulsiones con gotas de entre 20 a 200nm.
SMEDDS-Polímero	Mezclas de cuatro componentes, tensoactivo, cotensoactivo, aceite y polímero que en dispersión acuosa pueden formar nanocápsulas.
Vectorización	Liberación del principio activo en un sitio específico del cuerpo.



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades generales del ibuprofeno.....	32
Tabla 2.	Solubilidad del ibuprofeno en diversos disolventes orgánicos.....	33
Tabla 3.	Solubilidad del ibuprofeno en función del pH a 20° C.....	33
Tabla 4.	Tamaño de las nanopartículas y nanoesferas obtenido por DLS.	75
Tabla 5.	Potencial Z de las nanopartículas obtenidas.....	76
Tabla 6.	Tamaño de las nanocápsulas utilizando el software libre ImageJ®.....	79
Tabla 7.	Densidad de las nanopartículas desarrolladas.....	81
Tabla 8.	Resultados del estudio de linealidad. Disolvente etanol.....	83
Tabla 9.	Resultados del estudio de linealidad. Disolvente buffer de fosfatos.....	84
Tabla 10.	Resultados del estudio de precisión. Disolvente etanol.....	85
Tabla 11.	Resultados del estudio de precisión. Disolvente buffer de fosfatos.....	85
Tabla 12.	Resultados del estudio de exactitud. Disolvente etanol.....	86
Tabla 13.	Resultados del estudio de exactitud. Disolvente buffer de fosfatos.....	86
Tabla 14.	Resultados del estudio de precisión intermedia. Disolvente etanol.....	87
Tabla 15.	Resultados del estudio de precisión intermedia. Disolvente buffer de fosfatos.....	87
Tabla 16.	Presencia de nanocápsulas en las muestras de liberación tras diferentes tratamientos.....	89
Tabla 17.	Presencia de nanoesferas en las muestras de liberación tras diferentes tratamientos.....	89
Tabla 18.	Evaluación estadística del ajuste de los datos obtenidos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos.....	92
Tabla 19.	Evaluación estadística del ajuste de los datos obtenidos de liberación de nanoesferas a los modelos propuestos.....	95



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Obtención de nanocápsulas <i>in situ</i> . Administración oral.....	18
Figura 2.	Clasificación de los sistemas nanoparticulados como acarreadores de fármacos.....	20
Figura 3.	Formas en las que puede estar incluido un fármaco en una nanocápsula y en una nanoesfera.....	22
Figura 4.	Métodos de preparación de NP's poliméricas utilizando polímeros preformados.....	24
Figura 5.	Estructura de un glóbulo de aceite en una microemulsión o/w....	27
Figura 6.	Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y de la obtención de las nanocápsulas <i>in situ</i> desarrollados durante los estudios de maestría.....	29
Figura 7.	Mecanismo propuesto de formación de nanocápsulas <i>in situ</i> a través de una formulación SMEDDS modificada por la adición de un polímero.....	31
Figura 8.	Log P del ibuprofeno en función del pH en un sistema octanol/agua.....	34
Figura 9.	Espectro de absorción del ibuprofeno.....	36
Figura 10.	Carga superficial de una partícula coloidal en suspensión.....	51
Figura 11.	Metodología general para la fabricación y caracterización de NC's y NE's <i>in situ</i>	59
Figura 12.	Actividades realizadas durante la etapa de fabricación de las nanopartículas.....	60
Figura 13.	Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y obtención de nanocápsulas <i>in situ</i>	61
Figura 14.	Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y obtención de nanoesferas <i>in situ</i>	63
Figura 15.	Pruebas realizadas durante la etapa "caracterización de las nanopartículas".....	64



Figura 16.	Pruebas realizadas durante la etapa “eficiencia de encapsulación”.....	66
Figura 17.	Metodología para la determinación del porcentaje de encapsulación.....	68
Figura 18.	Pruebas realizadas durante la etapa “estudios de liberación”.....	69
Figura 19.	Filtros utilizados para la eliminación de nanopartículas en las muestras correspondientes a los estudios de liberación.....	70
Figura 20.	Uso de membrana de diálisis para la eliminación de nanopartículas en las muestras correspondientes a los estudios de liberación.....	71
Figura 21.	Metodología utilizada para desarrollar la evaluación de la membrana y los estudios de liberación.....	72
Figura 22.	Morfología externa de las nanocápsulas obtenidas 20 000x.....	77
Figura 23.	Morfología externa de las nanocápsulas obtenidas 50 000x.....	77
Figura 24.	Micrografía tratada con el software libre ImageJ®.....	78
Figura 25.	Marcadores de densidad en gradiente de Percoll® conteniendo: A, solo los marcadores; B, marcadores y NE's; C, marcadores y NC's.....	80
Figura 26.	Densidad de las nanocápsulas y nanoesferas obtenida a través de centrifugación isopícnica.	81
Figura 27.	Curva de calibración de ibuprofeno en etanol.....	83
Figura 28.	Curva de calibración de ibuprofeno en buffer de fosfatos pH 7.5.	84
Figura 29.	Perfiles de liberación promedio de las nanoesferas, nanocápsulas e ibuprofeno libre utilizando el método de membrana de diálisis.....	91
Figura 30	Ajuste de los datos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos. N=6.....	93
Figura 31.	Ajuste de los datos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos. N=6.....	94



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Propiedades del Copolímero de metilmetacrilato.....	112
Anexo 2 Propiedades del triglicérido de cadena media.....	114
Anexo 3 Propiedades del aceite de ricino polioxil hidrogenado.....	117
Anexo 4 Espectros de absorción UV del ibuprofeno.....	120
Anexo 5 Artículo.....	120



1 Introducción

A mediados de 1960 fue introducido el término *sistemas de liberación modificada* para describir un nuevo concepto en el diseño de formas de dosificación de fármacos. Los sistemas de liberación controlada son sistemas capaces de liberar idealmente una cantidad constante de fármaco durante un periodo prolongado de tiempo, independientemente de las características del sitio de administración, con la finalidad de obtener una concentración plasmática adecuada, predecible y reproducible (Tapash, Bhaskara 2004). Otras de las ventajas de los sistemas de liberación controlada son (Chien 1989):

- a) Disminución en la frecuencia de dosificación.
- b) Reducción de efectos tóxicos.
- c) Mejora la relación dosis-eficacia.
- d) Mayor aceptación del paciente.

En los últimos años se han obtenido grandes avances en el desarrollo de sistemas de liberación controlada, llegando incluso a dirigir la liberación de un fármaco hacia un sitio específico (vectorización). Estos avances han permitido la obtención de nuevos sistemas de liberación de fármacos que consideran tanto rutas de administración poco exploradas como la transdermal, la transmucosal y la transocular como novedosos dispositivos de liberación, por ejemplo, las microagujas, los implantes transdérmicos y las nanopartículas (Venkatraman et al. 2000).

Para propósitos farmacéuticos, las nanopartículas (NP's) se definen como sistemas submicrónicos coloidales con un diámetro de entre 100nm y 1000nm. Las NP's se construyen a través de ensambles de macromoléculas en donde el principio activo se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado e incluso adsorbido en la interface externa de la NP (Kreuter 1994). En general se distinguen dos tipos de NP's, las nanoesferas (NE's) con una estructura de tipo matricial y las nanocápsulas (NC's), que son sistemas de tipo reservorio compuestos por una membrana polimérica que rodea a un



núcleo oleoso (Couvreur et al. 1996). Las NC's por su estructura presentan varias ventajas sobre las NE's, como por ejemplo, tienen una alta eficiencia de encapsulación y un bajo contenido polimérico. Además, debido a que el fármaco se encuentra aislado por la cápsula polimérica, la irritación en el sitio de liberación y el efecto *burst* (liberación rápida del fármaco de la superficie de la partícula) presentes en las NE's se ven disminuidos en las NC's. (Couvreur et al. 2002).

En la literatura pueden encontrarse reportados diversos métodos de preparación de NP's. Estas metodologías comparten una serie de desventajas tecnológicas que han impedido su aplicación a escala industrial (Fisher, Khademhosseini, Peppas 2010; Kwon et al. 2001) por ejemplo:

- a) El uso de grandes cantidades de agua y disolventes orgánicos.
- b) La separación de las NP's del medio de preparación es costosa y complicada.
- c) Los procesos de recuperación y esterilización pueden conducir a la pérdida de la estructura y la funcionalidad del sistema.
- d) Es necesario utilizar equipos de dispersión de alto rendimiento (Ultra-turrax) para disminuir el tamaño de partícula de las NP's, lo que implica un alto costo energético.

Esta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevos métodos de preparación de nanopartículas, siendo los sistemas automicroemulsionables "SMEDDS" por sus siglas en inglés, de gran interés por sus propiedades. Los SMEDDS son mezclas de tres componentes, tensoactivo, cotensoactivo y aceite que en dispersión acuosa pueden formar microemulsiones con gotas de entre 20 a 200nm (Mou et al. 2008; Porter et al. 2008). La principal ventaja de los SMEDDS es su capacidad de autoemulsificar *in situ* en contacto con el agua y agitación muy ligera, pues existen reportes de que la motilidad del estómago y del intestino son capaces de proveer la agitación necesaria para la autoemulsificación *in vivo* (Pouton 1985). Cabe destacar que los SMEDDS exhiben una alta estabilidad y son capaces de incrementar la



biodisponibilidad (su pequeño tamaño les permite incrementar el área superficial de absorción del fármaco) y la solubilidad de fármacos con características lipofílicas.

Otra ventaja importante de los SMEDDS es su fácil manufactura y que el uso de triglicéridos en su formulación protege a los fármacos susceptibles a la degradación de las colinesterasas. También existe evidencia de que los triglicéridos son capaces de incrementar la absorción de neurofármacos. Aunque la desventaja más importante de los SMEDDS es que carecen de una pared rígida que les permita controlar y dirigir la liberación del principio activo (Date, Nagarsenker 2007).

Considerando lo anterior, durante los estudios de maestría se propuso adaptar una fórmula SMEDDS para contener a un polímero farmacéutico, de tal forma que al ser dispersada en agua con agitación ligera fuera capaz de formar nanocápsulas poliméricas *in situ*. Esta formulación podría colocarse en una cápsula de gelatina blanda y administrarse por vía oral, de tal forma que el contenido gástrico y el peristaltismo permitieran la obtención de nanocápsulas *in situ* (Figura 1). El mecanismo propuesto de formación, se discute a profundidad en la sección de antecedentes.

Con la finalidad de desarrollar este sistema, se evaluaron diferentes formulaciones, polímeros y metodologías de preparación del concentrado. Como resultado de ese trabajo se desarrolló una formulación SMEDDS-polímero conformada por aceite de ricino polietoxilado (Cremophor® EL) como tensoactivo, 40%; triglicéridos caprílicos/cápricos (Captex® 355) como fase oleosa, 30%; etanol absoluto como cotensoactivo, 30% y un copolímero de metil metacrilato (Eudragit® RL PO) en una proporción de 400 mg de polímero por 1.0 mL de aceite, que al ser dispersada en agua con agitación ligera dio lugar a la formación de partículas con un tamaño aproximado de 150 nm. Debido a que los resultados obtenidos durante esa etapa fueron alentadores pero insuficientes para establecer la naturaleza de las nanopartículas, se estableció que el propósito del trabajo de doctorado consistiría en recabar información experimental que permita corroborar la obtención de

nanocápsulas *in situ* utilizando el método desarrollado, tomando para ello como fármaco modelo de encapsulación al ibuprofeno y como sistema de comparación a un grupo de nanoesferas obtenidas utilizando el método de fabricación de nanocápsulas modificado.

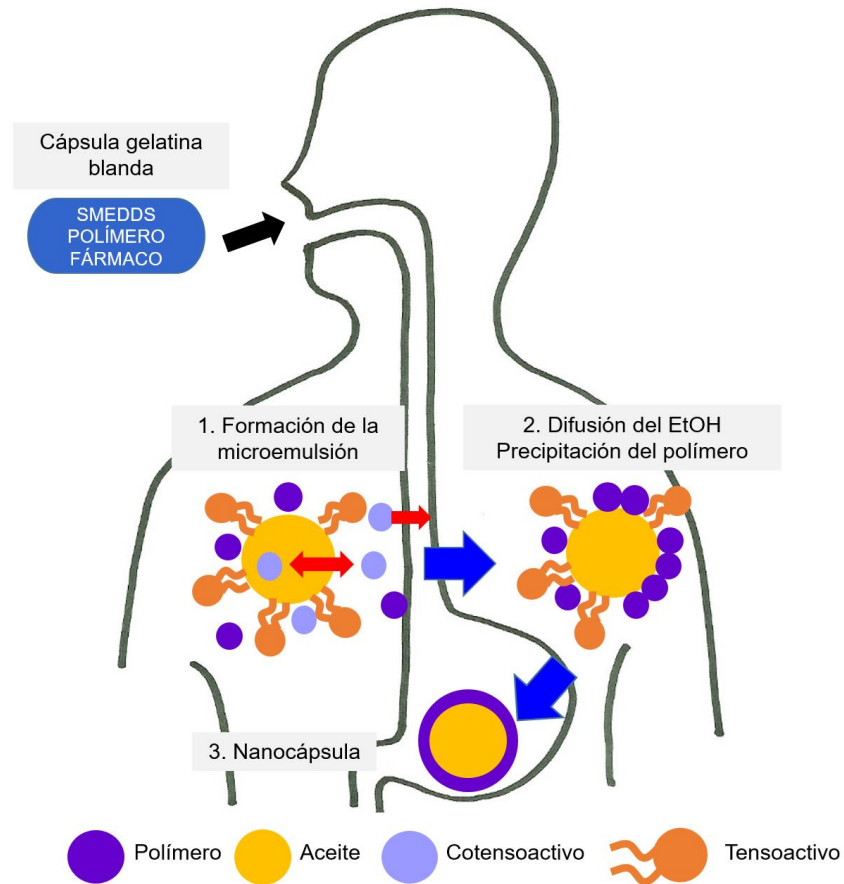


Figura 1. Obtención de nanocápsulas *in situ*. Administración oral
(Adaptado de Llera et al. 2017)



2 Antecedentes

2.1 Nanopartículas Farmacéuticas

Para propósitos farmacéuticos, las nanopartículas se han definido como partículas sólidas coloidales cuyo tamaño varía entre 100 nm a 1000 nm, constituidas por materiales macromoleculares en donde el principio activo puede estar disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o ligado (Kreuter 1994).

Desde hace varias décadas se ha estudiado a las nanopartículas como sistemas de liberación modificada de fármacos. Dentro de las características que convierten a las nanopartículas en prometedores vectores para la liberación de sustancias activas destacan:

- a) Su tamaño subcelular les permite penetrar eficientemente barreras biológicas lo que conlleva a la acumulación del fármaco en el sitio de acción, reduciendo los efectos adversos e incrementando su eficiencia terapéutica (Parveen et al. 2012).
- b) Su capacidad para mejorar la estabilidad de sustancias activas, ya que los materiales de los que están fabricadas pueden proteger al fármaco de factores que propicien su degradación, tales como el pH, enzimas, agentes oxidantes, etc. (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari 2010).

En la actualidad se ha desarrollado una amplia variedad de nanopartículas compuestas de diversos materiales tales como compuestos inorgánicos, lípidos y polímeros que imparten a cada sistema diversas propiedades fisicoquímicas capaces de responder a diferentes vías de administración, sitios de absorción, regímenes de dosificación y a las características de diferentes principios activos, incluyendo moléculas tan complejas como proteínas, enzimas y material genético. Una descripción de estos sistemas se incluye en la Figura 2.

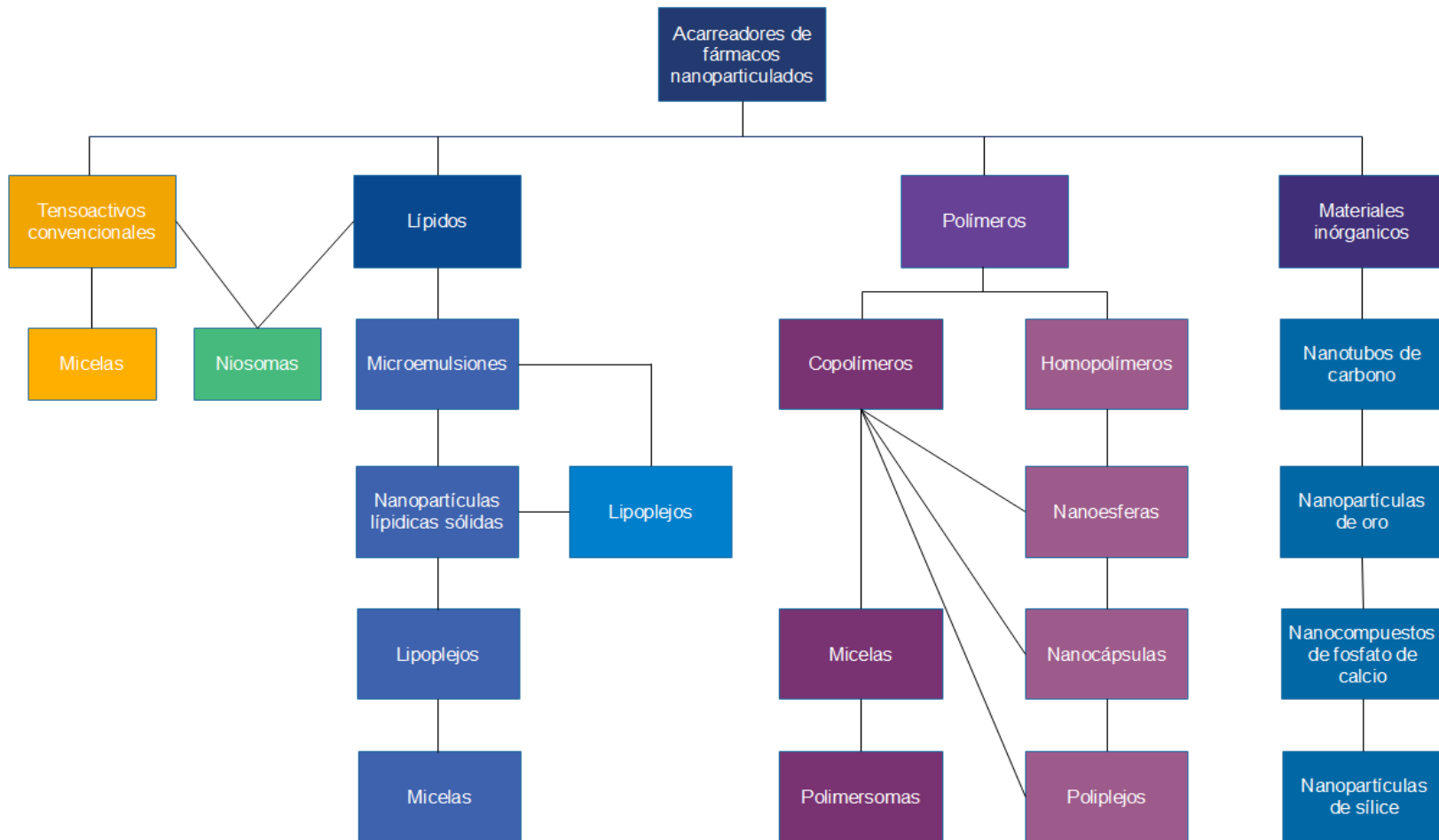


Figura 2. Clasificación de los sistemas nanoparticulados como acarreadores de fármacos (Adaptado de Letchford et al. 2007).



2.2 Nanopartículas poliméricas

Históricamente las primeras NP's propuestas como acarreadores para aplicaciones terapéuticas fueron fabricadas de gelatina y albúmina. Pero debido a su naturaleza peptídica eran capaces de despertar la respuesta inmune, por lo que se desarrollaron NP's hechas con polímeros sintéticos. Este fue un gran paso en el desarrollo de las NP's pues el uso de polímeros les aportó dos ventajas fundamentales sobre otros sistemas coloidales de liberación (liposomas, microemulsiones, etc.), una estructura rígida y la capacidad de extender y controlar la liberación del fármaco por medio de varios mecanismos (Fattal 2000). Otras de las ventajas relacionadas al uso de materiales poliméricos son (Mc Culloch 2009):

- a) Poseen un buen potencial para la modificación de su superficie y funcionalización con diferentes ligandos.
- b) Proveen un excelente control farmacocinético.
- c) Son capaces de retener y liberar una amplia variedad de agentes terapéuticos.
- d) Exhiben un excelente perfil de biocompatibilidad y biodegradación.
- e) Existe una amplia variedad de polímeros disponibles para aplicaciones farmacéuticas.

Entre los polímeros más utilizados se encuentran la gelatina, el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico-glicólico, los poli (metilmetacrilatos), el quitosan y los poli(alquilcianoacrilatos).

Además de la vectorización y la liberación controlada de fármacos, las nanopartículas poliméricas están relacionadas a diversas ventajas, entre las cuáles se encuentran el incremento de la solubilidad y la biodisponibilidad de los fármacos, el incremento del tiempo de circulación en la sangre y la capacidad de ser utilizadas por diversas vías de administración (Kumari et al. 2010).

Las nanopartículas a su vez pueden clasificarse en dos grupos bien definidos, las nanocápsulas y las nanoesferas. Las nanocápsulas (NC's) son sistemas vesiculares que actúan como una especie de reservorio en el que las sustancias atrapadas se limitan regularmente a una cavidad que consta de un núcleo líquido (agua o aceite) rodeado por una membrana de material sólido (Rao, Geckeler 2011). Con frecuencia el polímero circundante forma una monocapa. Estos sistemas han encontrado utilidad en la encapsulación y liberación de fármacos hidrofóbicos (Letchford, Burt 2007).

Las nanoesferas (NE's) por su parte son partículas sólidas de tipo matricial en donde el fármaco está típicamente embebido en una red polimérica, aunque también pueden encontrarse químicamente enlazado adsorbido a la superficie de la NE (Figura 3). (Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001).

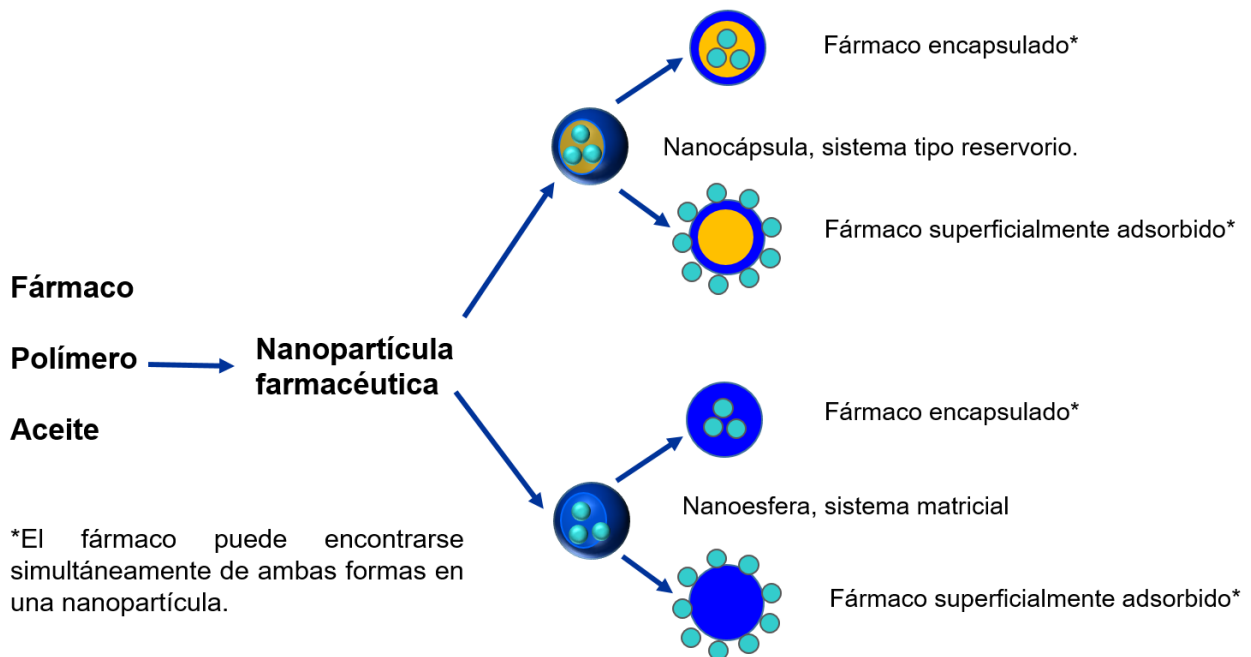


Figura 3. Formas en las que puede estar incluido un fármaco en una nanocápsula y en una nanoesfera (Adaptado de Fisher 2010).



De acuerdo con Mora-Huertas y colaboradores, las NC's poseen varias ventajas sobre las NE's como sistemas acarreadores de fármacos:

- a) Poseen una estructura rígida que permite extender y controlar la liberación de fármacos.
- b) Exhiben un excelente perfil de biocompatibilidad y biodegradación, además de un incremento de la solubilidad y la biodisponibilidad.
- c) Protegen al fármaco de la degradación causada por el medio biológico, siempre y cuando este se encuentre encapsulado.
- d) Causan una menor irritación en el sitio de liberación ya que el fármaco se encuentra aislado por la cápsula polimérica.
- e) No presentan el efecto *Burst*, común en las NE's.

2.3 Métodos de fabricación de nanopartículas poliméricas

En la literatura pueden encontrarse reportados diversos métodos de preparación de nanopartículas poliméricas. Existen dos enfoques principales en la clasificación de estos métodos; el primero distingue entre el uso de polímeros preformados y el uso de monómeros en donde se espera que la reacción de polimerización se lleve a cabo en el medio en el que se forman las nanopartículas (*polimerización in situ*) (Couvreur 1996).

Las metodologías que involucran la aplicación de monómeros para llevar a cabo reacciones de polimerización *in situ*, se han vuelto obsoletas debido a la alta toxicidad de los monómeros y a la dificultad de asegurar que estos reaccionen completamente o sean eliminados a través de los métodos de purificación convencionales (Couvreur 1996).

El segundo enfoque considera el uso de polímeros preformados, partiendo de una emulsión y utiliza las propiedades fisicoquímicas del polímero, comúnmente la solubilidad, para desolvatar al sistema.

La Figura 4 resume algunas de las metodologías más importantes para la obtención de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros preformados.

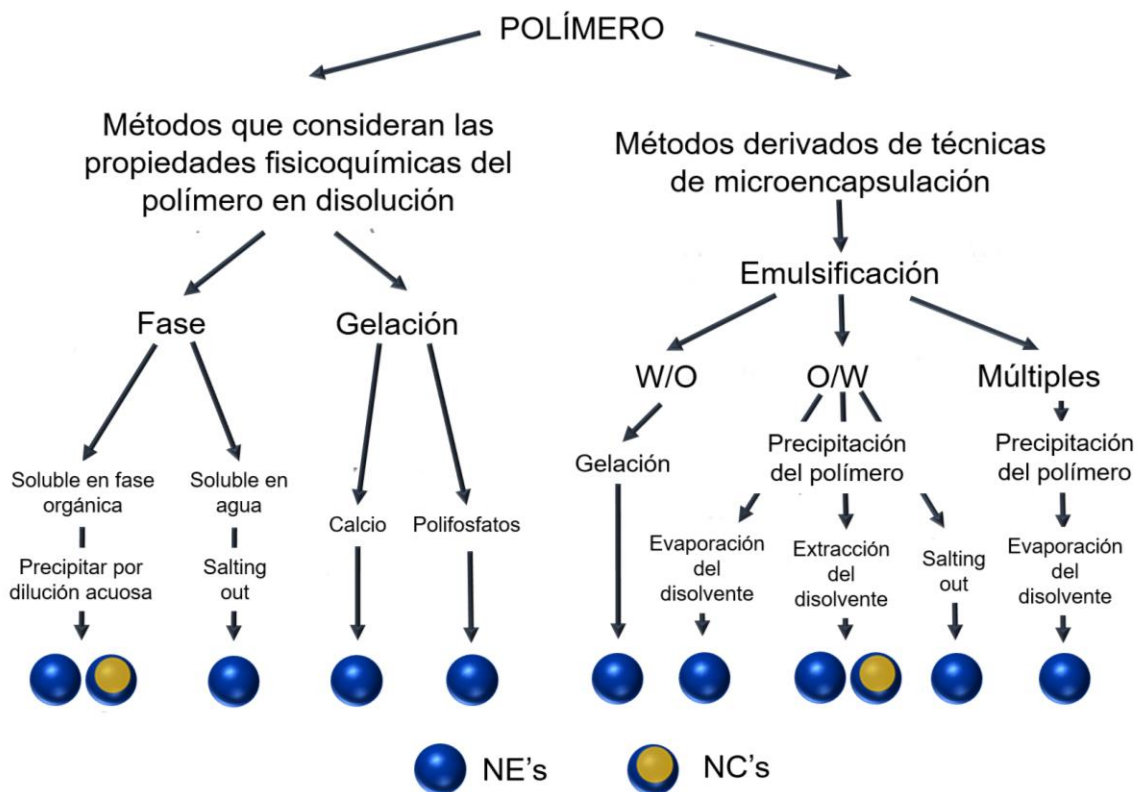


Figura 4. Métodos de preparación de NP's poliméricas utilizando polímeros preformados

(Adaptado de Couvreur 1996)

A continuación se proporciona una breve descripción de algunos métodos tradicionales para la fabricación de NC's.



2.3.1 Evaporación de disolvente

El polímero se solubiliza en un disolvente inmisible en agua y el principio activo se dispersa o disuelve en la disolución polimérica. La mezcla resultante se adiciona a una fase acuosa en la que se emulsifica con ayuda de un agitador adecuado obteniéndose gotas discretas. Conforme se produce la evaporación del disolvente, las NC's se vuelven sólidas (O'Donnell, McGinity 1997).

2.3.2. Nanoprecipitación

Requiere de dos disolventes que sean miscibles entre sí. Idealmente, el polímero y el fármaco son solubles en el primer disolvente pero no en el segundo. La nanoprecipitación ocurre debido a la desolvatación del polímero cuando la disolución del mismo se adiciona al segundo "no" disolvente, ya que conforme el disolvente que contiene al polímero difunde a través del medio de dispersión, el polímero precipita, encapsulando al fármaco (Bilati, Allémann, Doelker 2005).

2.3.4 Emulsificación - *Salting out*

Para esta técnica se selecciona un disolvente para el polímero que sea miscible en agua. Este se emulsiona adicionándolo a la fase acuosa, empleando altas concentraciones de alguna sal o sacarosa seleccionadas por su gran capacidad de producir el efecto de *salting-out*. La precipitación del polímero disuelto se induce al diluir la emulsión lo que produce una súbita disminución de la concentración de la sal o sacarosa en la fase continua de la emulsión, induciendo al disolvente del polímero a migrar fuera de las gotas de la emulsión (Vauthier, Bouchemal 2009).

En general, existen pocas metodologías disponibles para la obtención de nanocápsulas y muchas de ellas proporcionan mezclas de nanocápsulas y nanoesferas (Figura 4). Todas las técnicas descritas con anterioridad requieren de varios pasos de purificación, pues en las aguas madres se pueden encontrar impurezas potencialmente tóxicas tales como, disolventes orgánicos, estabilizantes,



y grandes agregados poliméricos (Charcosset, Limayem, Fessi 2004). Es por ello que se recurre a diversas metodologías de recuperación y purificación, entre las más utilizadas se encuentran la ultrafiltración, ultracentrifugación, diálisis, filtración en gel y evaporación a presión reducida (Venier-Julienne, Benoît 1996). La gran desventaja de estos métodos de purificación radica en que son altamente costosos y requieren del uso de equipo especializado. Adicionalmente, la mayoría de las técnicas de purificación conllevan a la agregación de las NC's y con ello a la pérdida de su estructura y funcionalidad (Prasad, Geckeler 2011).

Otras de las desventajas asociadas a estas técnicas de obtención de nanopartículas son: (Kwon 2001).

- a) El uso de grandes cantidades de agua y disolventes orgánicos.
- b) La separación de las NP's de las aguas madres es costosa y complicada.
- c) Exhiben problemas de estabilidad, principalmente tras su purificación y esterilización.
- d) Es difícil conservar la estructura capsular de los sistemas.
- e) Es necesario utilizar equipos de dispersión de alto rendimiento (rotor-estator, alta presión, etc.) para disminuir el tamaño de partícula de las NP's.

Todas estas desventajas han impedido la aplicación de las NP's como formas farmacéuticas de liberación controlada a gran escala.

2.4 SELF MICROEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS (SMEDDS)

Los self microemulsifying drug delivery systems SMEDDS (Sistemas automicroemulsificables) son sistemas compuestos por aceite, tensoactivo, y cotensoactivo (Zhao et al. 2010) Figura 5. Son fácilmente dispersables en agua mediante leve agitación mecánica formando espontáneamente una microemulsión

O/W (Nigade, Patil, Tiwari 2012) cuyas partículas poseen un diámetro que va desde 20 hasta 200 nm (Elgannar, El-Massik, Abdallah 2009).

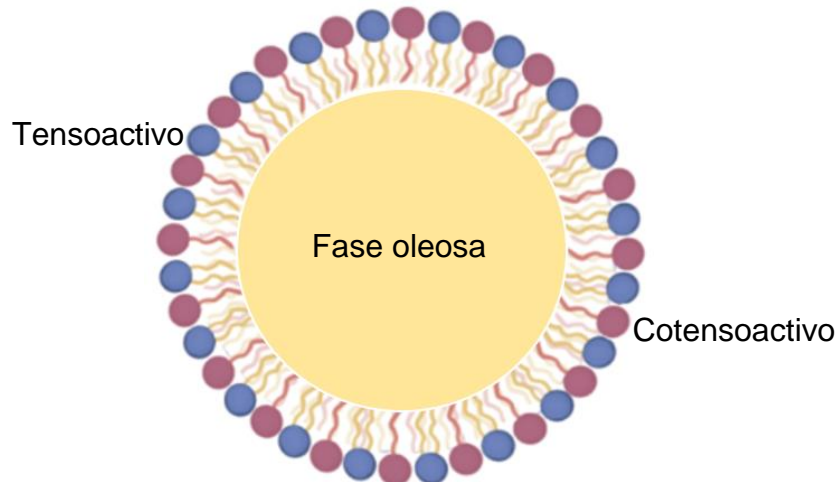


Figura 5. Estructura de un glóbulo de aceite en una microemulsión o/w

El fenómeno de microemulsificación se encuentra influenciado por diversos factores. Para su formulación se deben tomar en cuenta la naturaleza y concentración de cada uno de los componentes: la proporción aceite/tensoactivo y tensoactivo/cotensoactivo, la temperatura, el pH del medio de dispersión y las propiedades fisicoquímicas del fármaco en cuestión, tales como el logP, el pKa y la polaridad (Lawrence, Rees 2008).

2.5 Obtención de nanopartículas *in situ* utilizando SMEDDS

Para aplicaciones farmacéuticas, numerosos estudios han establecido que es posible obtener formulaciones SMEDDS utilizando como fase oleosa triglicéridos de cadena media, que tienen como función adicional disolver el principio activo para encapsularlo y tensoactivos preferentemente no iónicos con valores de HLB aproximadamente de 11 (Pouton 1997).



En cuanto al cotensoactivo, en la literatura se reporta que este debe ser miscible con la fase oleosa y acuosa y ser capaz de situarse dentro de la monocapa de tensoactivo ubicada en la interfase del sistema. Con este fin se han utilizado tensoactivos no iónicos (Sagitani, Friberg 1980; Osborne, Middleton, Rogers 1988) y alcoholes de cadena corta (Attwood, Mallon, Taylor 1992).

Los alcoholes de cadena corta han sido utilizados con frecuencia debido a que reducen la tensión superficial del sistema e incrementan su fluidez, lo que conduce a un aumento de la entropía y con ello de la estabilidad del sistema (Attwood 1994; Tenjarla 1999).

Para la obtención de nanopartículas *in situ* el método desarrollado durante los estudios de maestría consideró la adición de un polímero farmacéutico a un concentrado SMEDDS (aceite, tensoactivo, cotensoactivo), de tal forma que al dispersar la fórmula con agitación ligera en un medio acuoso, las gotas de aceite formadas por la microemulsión proporcionarían un molde para la precipitación del polímero y la consiguiente formación de la nanocápsula.

En nuestro caso las características del cotensoactivo resultaron de vital importancia ya que por la naturaleza de los SMEDDS, no existe otro componente en el concentrado capaz de disolver al polímero que deseamos incorporar a la fórmula. Una condición adicional que debe cumplir el cotensoactivo de la fórmula seleccionada es que debe difundir hacia el medio acuoso desolvatando al polímero, permitiendo su precipitación en la superficie del glóbulo de aceite, para dar lugar a la cápsula polimérica rígida.

De entre las alternativas presentadas los alcoholes son la mejor opción, por lo que la presencia de un alcohol de cadena corta en el concentrado resultó determinante en la elección de la formulación. Finalmente se seleccionó y adaptó la fórmula

propuesta por Khoo y colaboradores debido a que el etanol que incluye como cotensoactivo es miscible al agua y es capaz de disolver a varios polímeros farmacéuticos, el resto de los componentes de esta formulación son el Cremophor® EL como tensoactivo y el Captex® 355 como aceite. Otro motivo para seleccionar esta fórmula es porque sus componentes son seguros para su aplicación farmacéutica, y porque a través de ellos se han obtenido sistemas SMEDDS estables. En particular, el uso del Cremophor® en SMEDDS ha sido ampliamente documentado (Rao, Shao 2008; Liu et al. 2009).

El proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero es el siguiente: La fase oleosa se adiciona con agitación continua al tensoactivo manteniendo una temperatura de 36° C para facilitar su incorporación. A la mezcla anterior se adiciona lentamente el gel previamente formado por el polímero y el cotensoactivo; la agitación se mantiene hasta obtener un sistema homogéneo (aproximadamente 3 horas), la mezcla resultante constituye al sistema SMEDDS-polímero.

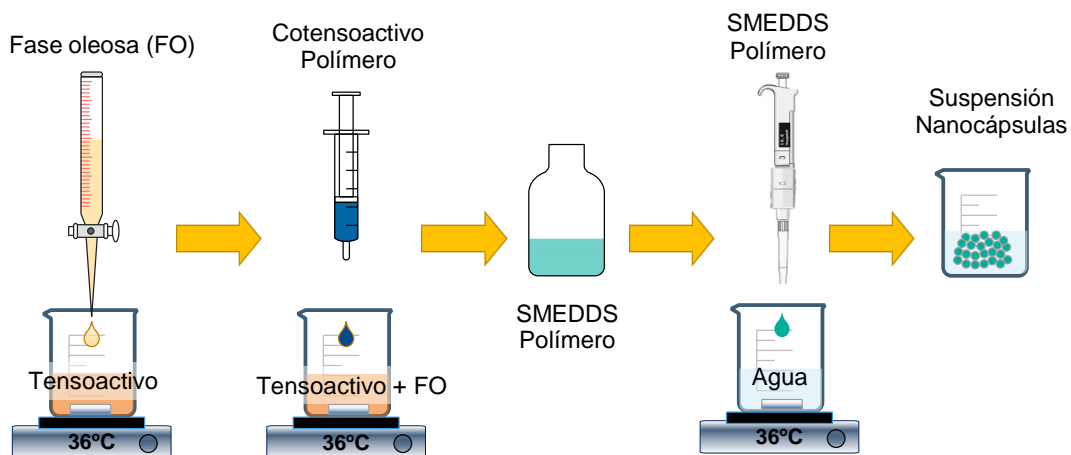


Figura 6. Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y de la obtención de las nanocápsulas *in situ* desarrollados durante los estudios de maestría.

Para la obtención de las nanocápsulas *in situ* (Figura 6) 1.0 mL del concentrado SMEDDS-polímero se adiciona gota a gota y con agitación magnética vigorosa a un



volumen de 50.0 mL de agua destilada a una temperatura de $36.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, el sistema se mantiene en agitación durante al menos 30 minutos para favorecer la evaporación del cotensoactivo.

Para explicar el proceso de formación de las nanocápsulas en el sistema propuesto, es necesario establecer que éste se lleva a cabo en 2 pasos, (Figuras 6 y 7).

1. La obtención de los glóbulos de aceite que constituirán al núcleo de las nanocápsulas, proporcionado por el sistema SMEDDS.
2. La formación de la membrana polimérica alrededor del núcleo oleoso por efecto de la difusión del etanol hacia el medio acuoso, y la precipitación del polímero en la interfase del glóbulo de aceite. En cuanto a la obtención de los glóbulos de aceite proporcionados por la microemulsión, es importante resaltar que la espontaneidad de su formación es el resultado de un estado de no-equilibrio entre dos líquidos, en donde el proceso de emulsificación espontánea incrementa la entropía y disminuye la energía libre de Gibbs del sistema, estabilizándolo. (Rehbinder, Lichtman 1957).

Una fuente adicional de energía necesaria para la obtención de los glóbulos de aceite proviene de las turbulencias interfaciales inducidas por la difusión del etanol de la formulación hacia el medio acuoso. Estas turbulencias dan lugar a pequeñas *corrugaciones* interfaciales que finalmente llevan a la separación de los glóbulos de aceite (Otrovsky, Good 1984). Este mecanismo teórico fue propuesto por Ruschak y Miller y ha sido ampliamente corroborado (Ruschak, Miller 1972).

Finalmente, la formación de la nanocápsula puede explicarse considerando la solubilidad del polímero y la miscibilidad del etanol de la formulación. En el concentrado el etanol permite solubilizar al polímero, pero al adicionar la fórmula al medio acuoso, el etanol difunde hacia el agua estabilizando a la microemulsión y al mismo tiempo desolvatando al polímero en la interfase, el cuál precipita sobre los

glóbulos de la microemulsión formando la membrana polimérica de la nanocápsula (Fessi et al 1989).

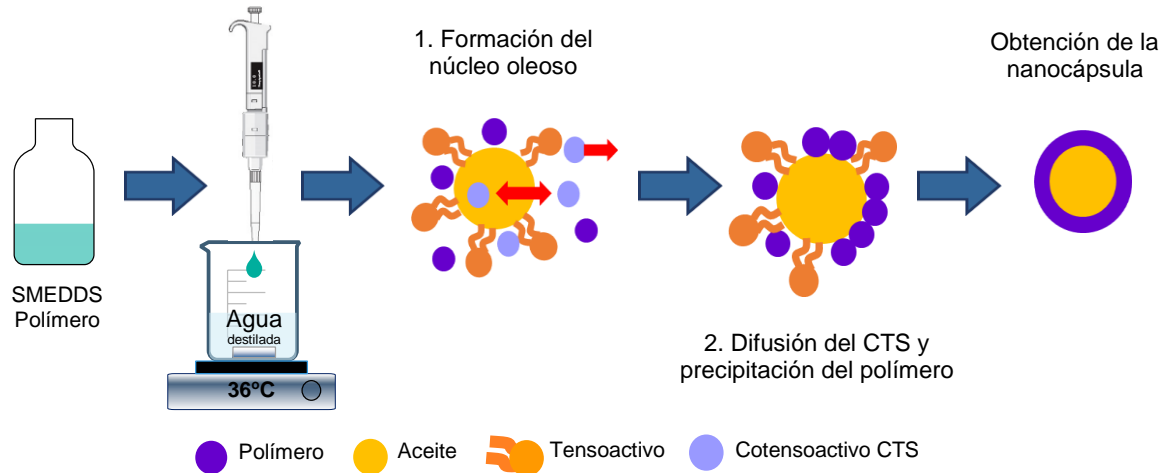


Figura 7. Mecanismo propuesto de formación de nanocápsulas in situ a través de una formulación SMEDDS modificada por la adición de un polímero.

2.6 Fármaco modelo, ibuprofeno

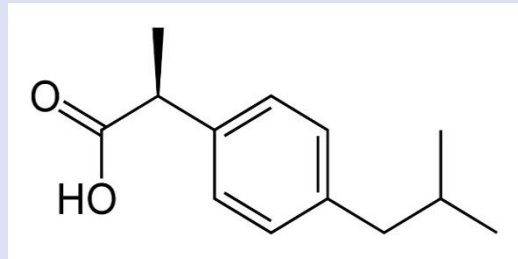
2.6.1 Generalidades

El ibuprofeno fue introducido al mercado al final de la década de 1960, como un antiinflamatorio no esteroideo para el tratamiento de un amplio rango de padecimientos, incluidos dolor, inflamación, artritis, fiebre y dismenorrea. La dosis usual es de 600-1800 mg/día y comúnmente se distribuye en forma de comprimidos con dosis que van de los 200 a los 800 mg.

Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la cicloxigenasa (COX). Este fármaco se absorbe rápidamente y posee una alta capacidad de fijación a proteínas, presenta metabolismo hepático (90% del producto se metaboliza en sus derivados hidroxilado o carboxilado) y los metabolitos se excretan por los riñones y su vida media es de dos horas. La Tabla 1 resume las propiedades más importantes del ibuprofeno.



Tabla 1. Propiedades generales del ibuprofeno

Nombre IUPAC	pKa	Fórmula
ácido(RS)-2-(4isobutilfenil)propanoico	4.91	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Peso molecular	Punto de fusión	Biodisponibilidad
206.29 g/mol	76 °C	49–73%
Unión proteica	Metabolismo	Vida media
99%	Hepático (CYP2C9)	1.8-2 horas
Estructura	Vías de administración	Solubilidad
	Oral, tópica, IV, rectal	Acuosa 0.021mg/mL Soluble en etanol y acetona
Nombre IUPAC	pKa	Fórmula
ácido(RS)-2-(4isobutilfenil)propanoico	4.91	C ₁₃ H ₁₈ O ₂

2.6.2 Propiedades fisicoquímicas

Actividad Óptica

El ibuprofeno se obtiene como una mezcla racémica, por lo que no exhibe actividad óptica. Sin embargo el racemato puede ser separado fácilmente de sus enantiómeros (Brittain 2001).

Solubilidad

La solubilidad del ibuprofeno en disolventes no acuosos se muestra en la Tabla 2. En general e ibuprofeno es fácilmente soluble en alcoholes, hidrocarburos halogenados, dimetil sulfóxido y moderadamente soluble en disolventes no polares.



Debido a que su pKa se encuentra entre 4.5-4.6, es insoluble en disoluciones acuosas con un pH ácido y fácilmente soluble a pH básico (Tabla 3) (Brittain 2001).

Tabla 2. Solubilidad del ibuprofeno en diversos disolventes orgánicos

Disolvente %w/w	Solubilidad aproximada mg / mL
Heptano	2.3-2.6
Hexano	3.3-3.6
Éter de petróleo	2.3-2.6
Cloroformo	65-70
Dimetilsulfóxido	55-60
Propilenglicol	20-25
Etilenglicol	2-2.5
Acetona	60-65
Metanol	60-70
Etanol	60-70
Alcohol isopropílico	30-32
N-octanol	20-22

Tabla 3. Solubilidad del ibuprofeno en función del pH a 20° C

pH	Solubilidad (mg/mL)
1	<0.1
3	<0.1
4	<0.1
5	1.0



Coeficiente de partición (Log P)

La lipofilidad es uno de los parámetros fisicoquímicos utilizados para describir el comportamiento de un fármaco en el cuerpo, pues permite predecir procesos tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción. Además refleja la capacidad de un fármaco para permear la membrana celular a través de la vía transcelular o el llamado mecanismo pasivo (Krämer 1999). La lipofilidad se indica en términos del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua (log Pow). Pow se determina tradicionalmente midiendo la relación de la concentración de fármaco dividida en octanol (C_o) a su concentración en agua (C_w) en el equilibrio: $Pow = C_o / C_w$ (Wattanasin et al. 2014).

En el caso del ibuprofeno (Figura 8) puede observarse el efecto del pH en su coeficiente de partición. En donde a valores ácidos de pH el ibuprofeno se encontrará en su estado no ionizado, en el que preferirá disolverse en la fase oleosa, conduciendo a valores de logP positivos. Mientras que a valores de pH típicamente básicos tenderá a encontrarse en su estado ionizado, migrando mayoritariamente a la fase acuosa, por lo que su valor de log P tenderá a ser negativo. (Brittain 2001)

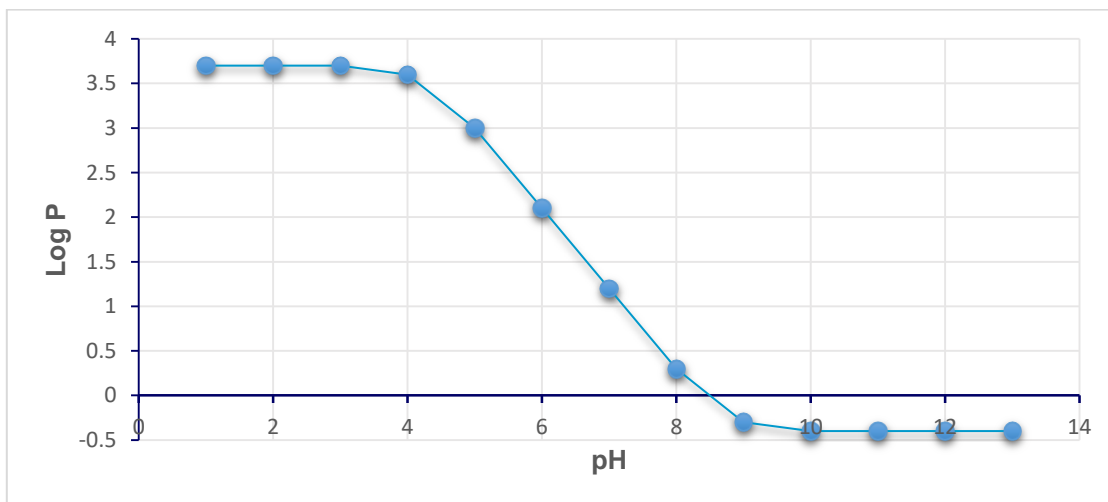


Figura 8. Log P del ibuprofeno en función del pH en un sistema octanol/agua (Brittain 2001)



Espectroscopía UV – VIS

La espectroscopía óptica es una técnica analítica que permite obtener mediciones cuantitativas a partir de la interacción de la luz con la materia. El espectro electromagnético comprende desde los rayos γ (10^{-4} a 10^{-1} nm) hasta las microondas (1mm-100cm) (Maikala 2010). Debido a que la radiación electromagnética se comporta en forma de “paquetes” discretos de energía llamados fotones, la energía luminosa en forma de ondas electromagnéticas se considera fotones. (Lamola, Turro 1977).

Cuando los fotones de diferentes longitudes de onda inciden sobre la materia, las características de la luz transmitida dependerán de las características de absorción, dispersión y reflexión de la muestra (Maikala 2010).

La “absorción” se define como la pérdida de fotones como resultado del paso de los electrones de valencia de las moléculas que componen a la muestra de un estado basal a un estado excitado. La “reflexión” consiste en la retrodispersión de la luz incidente y finalmente la “extinción” se refiere a la pérdida completa de los fotones al pasar a través de la muestra. La cuantificación de un analito a través de su absorción esta descrita en la ecuación de Lambert-Beer (Mäntele, Deniz 2017)

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

En donde:

A: Absorbancia

T: Transmisión

I_0, I : Es la intensidad del haz de luz antes / después de atravesar a la muestra.

ε : Es el coeficiente de absorción molar

c: Concentración

d: Trayectoria de medición de la muestra



Es importante considerar que en disolución, las moléculas del analito se encuentran rodeadas de moléculas de disolvente, y que pueden presentarse interacciones soluto – disolvente de diversa magnitud capaces de afectar a las bandas de absorción electrónica. Estos efectos inespecíficos de los disolventes dependen de la intensidad de la interacción soluto-disolvente y por lo tanto de su afinidad.

En el caso del ibuprofeno, puede observarse este efecto en la Figura 9 en donde las bandas de absorción se modifican ligeramente en función del disolvente utilizado.

A pesar de que el ibuprofeno es soluble en ambos medios, resulta claro el corrimiento del máximo de absorción debido a la mayor afinidad del fármaco por el metanol que por disoluciones diluídas de NaOH.

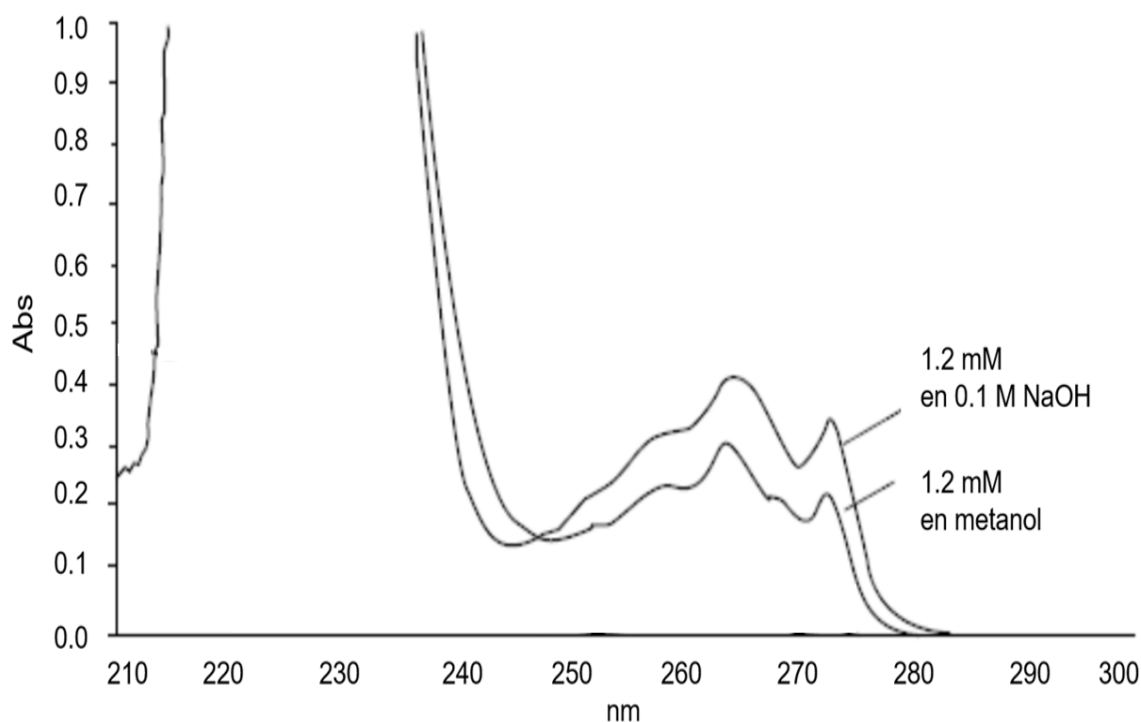


Figura 9. Espectro de absorción del ibuprofeno en metanol y en una disolución 0.1 M de NaOH. (Brittain 2001)



2.7 Estudios de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* generalmente se llevan a cabo para cumplir con alguno de los siguientes objetivos (Burguess et al 2002; D'Souza, DeLucca 2006):

- 1) Como una determinación indirecta de la biodisponibilidad del fármaco, especialmente en primeras etapas del desarrollo de nuevos productos.
- 2) Para el control de calidad, el cumplimiento de las especificaciones permite demostrar que la forma farmacéutica analizada es eficaz.
- 3) Evaluar el impacto de los excipientes y los métodos de fabricación que puedan influir en la biodisponibilidad.
- 4) Como requisito farmacopeico.

Los métodos indicados en la farmacopea de los Estados Unidos (USP) son por lo general empleados para evaluar los perfiles de liberación de fármacos a partir de formas farmacéuticas convencionales (D'Souza 2014). En el caso de los sistemas micro y nanoparticulados estos aparatos no resultan ser los más adecuados debido a las siguientes razones (Martínez et al. 2007; Martínez 2010):

- A. Resulta difícil separar al fármaco libre de las partículas sin disolver durante la toma de muestras.
- B. Es necesario utilizar enzimas para la liberación de fármacos a partir partículas poliméricas biodegradables.

Adicionalmente, el propósito de llevar a cabo estudios de liberación de fármacos desde sistemas micro/nanoparticulados es caracterizar la velocidad y mecanismo de liberación, a diferencia de las formas farmacéuticas convencionales en donde generalmente el estudio de liberación es de corta duración y permite evaluar de manera rutinaria la calidad de los lotes fabricados (D'Souza 2014).



En la actualidad, los métodos desarrollados para evaluar la liberación de fármacos a partir de formas de dosificación de tamaño nanométrico pueden ser agrupados en tres categorías; muestreo y separación (MS), flujo continuo (FC) y membrana de diálisis (MD) (D'Souza 2014).

2.7.1 Métodos de muestreo y separación (MS)

Las nanopartículas cargadas con el principio activo se introducen en un recipiente adecuado que contiene al medio de liberación mantenido a una temperatura constante. La liberación del fármaco se evalúa mediante el muestreo del medio de liberación (filtrado o el sobrenadante) o de las nanopartículas. La selección del medio considera la solubilidad del fármaco y su estabilidad durante el estudio. Las modificaciones de la técnica básica para estudiar la liberación del fármaco incluyen el volumen del medio, la velocidad de agitación y las técnicas de muestreo (D'Souza 2014).

La elección del tamaño del contenedor depende del volumen del medio de disolución necesario para mantener las condiciones *sink* sin comprometer la sensibilidad del ensayo. (Heng et al 2008; Kilic, Capan, Vural 2005; Zhang, Wang, Li 2014). De esta forma, se utilizan tubos o viales cuando el volumen del medio de liberación es pequeño y vasos o matraces cuando se requiere de volúmenes de medio más grandes (Verreck, Chun, Rosenblatt 2003; Sanna, Rogio, Siliani 2012).

Para sistemas como las nanopartículas, la agitación del medio de liberación resulta crítica en el proceso de liberación *in vitro* ya que evita que las nanopartículas se agreguen. Mientras que la agitación del medio de liberación se logra fácilmente a través de los aparatos I o II de la USP, el medio contenido en viales debe ser agitado con el uso de técnicas alternativas tales como agitadores magnéticos o baños con agitación (Danhier, Lecouturier, Vroman 2009; Li, Pei, Zhang 2001; Prahba et al 2002).



La liberación del fármaco se monitorea mediante la separación física de las nanopartículas del medio de liberación, seguido del análisis del fármaco libre o del fármaco contenido en las partículas (Sanna et al. 2012). La inclusión de un paso de centrifugación de las muestras es sumamente común y puede ser seguida por el análisis del sobrenadante o del fármaco restante en las nanopartículas (técnica destructiva) (Zhang et al 2014; Danhier et al 2009; Wallace et al 2012). El volumen de sobrenadante retirado depende de la solubilidad del fármaco, su estabilidad, la sensibilidad del ensayo y el mantenimiento de las condiciones *sink*. (D'Souza 2014). Para mantener estas condiciones durante el estudio de liberación *in vitro* se puede añadir una cantidad igual de medio de liberación fresco.

Estas técnicas proporcionan una evaluación directa de la liberación *in vitro*. Sin embargo, la agregación de las nanopartículas es una preocupación importante y puede llevar a velocidades de liberación bajas (Kim 1997). La pérdida en el volumen debido a la filtración durante el muestreo y sustitución de medio son poco recomendados cuando la cantidad de medio de liberación es pequeña. La filtración de la muestra no puede ser utilizada con fármacos que se adsorban al filtro.

2.7.2 Métodos de flujo continuo (FC)

En los métodos de FC, la liberación del fármaco desde las nanopartículas se evalúa utilizando el aparato IV de la USP o una adaptación del mismo. La liberación del fármaco se produce como resultado de la recirculación constante del medio de liberación a través de una columna que contiene a las nanopartículas y se monitorea mediante la recolección de muestras a intervalos periódicos (D'Souza 2014). Al igual que con los métodos MS, la selección de los medios de liberación se realiza considerando la solubilidad del fármaco y su estabilidad durante el estudio de liberación.



El método FC intenta simular el ambiente *in vivo* mediante la constante circulación de un pequeño volumen de medio de disolución para provocar la disolución y la difusión del fármaco. La principal desventaja de este método es la variación en la velocidad de flujo debido a la obstrucción del filtro, lo que conduce al aumento de la presión en el sistema. (D'Souza 2014).

2.7.3 Métodos de diálisis

En estos métodos, las nanopartículas cargadas con fármaco son separadas físicamente del medio de disolución a través del uso de una membrana de diálisis, el uso de este tipo de membranas facilita el muestreo a intervalos periódicos. La variedad más utilizada de estos métodos es la bolsa de diálisis, en donde una suspensión de nanopartículas se introduce en una bolsa que es sellada y colocada en un recipiente que contiene medio de disolución. (Yan et al 2010; Calvo, Vila-Jato, Alonso 1996). En general, el volumen encerrado en la bolsa de diálisis es significativamente menor que el medio de liberación (Yan et al. 2010; Muthu, Singh 2009). En este método, el fármaco liberado a partir de las nanopartículas difunde a través de la membrana de diálisis al compartimento exterior desde donde se toman las muestras para el análisis.

Otra variación de estas técnicas es el método de diálisis reversa, en donde las nanopartículas son colocadas en el compartimento exterior y la liberación del fármaco es muestreada al interior de la bolsa de diálisis (Calvo, Vila-Jato, Alonso 1996; Levy, Benita 2009; Xu, Khan, Burgess 2012). Otras adaptaciones incluyen la diálisis lado a lado (donde las celdas donadora y receptora, que contienen volúmenes iguales de medio de disolución bajo agitación, están separadas por una membrana de diálisis y el muestreo se realiza a partir de la celda receptora), y la celda de difusión de Franz (Kilfoyle et al. 2012; Uprit 2013).



En los métodos de diálisis resulta fundamental la selección de un apropiado peso molecular nominal límite (PMNL) para la membrana de diálisis, debido a que la premisa básica del este método es que el fármaco que se libera de la forma de dosificación difundirá rápidamente de un compartimento, a través de la membrana, y entrará en el segundo compartimento desde donde se tomarán muestras para el análisis. Por lo tanto, las membranas más utilizadas son aquellas con un nivel alto de PMNL (Calvo, Vila-Jato, Alonso 1996; D'Souza 2014).

2.8 Modelos matemáticos de liberación

Los estudios de liberación *in vitro* han sido reconocidos como una importante herramienta en el desarrollo y la evaluación de formas farmacéuticas.

Actualmente existen varias teorías y modelos cinéticos para describir el proceso de disolución de un fármaco a partir de una forma farmacéutica de liberación modificada.

Estos modelos permiten interpretar la información obtenida en la prueba de disolución a través de ecuaciones matemáticas que consideran algunas características de la forma farmacéutica tales como la porosidad y la forma entre otras.

En algunos casos estas ecuaciones pueden ser deducidas a través de un análisis teórico del proceso de disolución, por ejemplo la ecuación cinética de orden cero. En otros, no existe un fundamento teórico y las ecuaciones son el resultado del trabajo empírico (Costa, Sousa 2001).

2.8.1 Modelo cinético de orden cero

La disolución de un fármaco a partir de una forma farmacéutica que no se disgrega y libera lentamente al principio activo (asumiendo que el área expuesta se mantiene constante y no se alcanzan condiciones de equilibrio) puede ser representada por la siguiente ecuación:



$$W_0 - W_t = Kt \quad (2)$$

En donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica, W_t es la cantidad de fármaco disuelta al tiempo t y K es una constante de proporcionalidad. Dividiendo esta ecuación entre W_0 y simplificando:

$$f_t = K_0t \quad (3)$$

En donde $f_t = 1 - (W_t/W_0)$, t representa al tiempo y K_0 la constante aparente de disolución o la constante de liberación de orden cero. De esta forma, al graficar la fracción de fármaco disuelto contra el tiempo debe ser lineal, si las condiciones inicialmente expuestas se cumplen.

Esta relación puede ser utilizada para describir la disolución de un fármaco a partir de varios tipos de sistemas de liberación modificada, por ejemplo, sistemas transdérmicos, tabletas matriciales con fármacos poco solubles (Varelas et. al. 1995), formas farmacéuticas de tipo reservorio, sistemas osmóticos, etc. Las formas farmacéuticas que cumplen con este perfil, liberan la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo y representan el modelo ideal de liberación para la obtención de un sistema de acción prolongada (Costa, Sousa 2001).

2.8.2 Modelo cinético de orden uno

La aplicación de este modelo en los estudios de disolución de fármacos fue propuesta por Gibaldi y Feldman (1967) y después por Wegner (1969). Este modelo considera que el fenómeno de disolución de una partícula sólida en un medio líquido conlleva una acción superficial, que puede ser descrita por la ecuación de Noyes-Whitney:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C) \quad (4)$$



Donde C es la concentración del soluto al tiempo t , C_s es la solubilidad en el equilibrio, y K es la constante de proporcionalidad de primer orden. Esta ecuación fue modificada por Brunner y colaboradores en 1900, para incorporar el valor del área accesible a la disolución S , obteniendo:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 S (C_s - C) \quad (5)$$

Donde k_1 es una nueva constante de proporcionalidad. Utilizando la primera ley de Fick es posible establecer la siguiente relación para la constante k_1 :

$$k_1 = \frac{D}{Vh} \quad (6)$$

Donde D es el coeficiente de difusión del soluto en el medio de disolución, V es el volumen de disolución y h es el espesor de la capa de difusión. Hixson y Crowell adaptaron la ecuación de Noyes-Whitney:

$$\frac{dW}{dt} = KS(C_s - C) \quad (7)$$

Dónde W es la cantidad de soluto en la disolución al tiempo t , dW/dt es la velocidad a la que el soluto se incorpora al medio de disolución en el tiempo t y K es una constante. Esta última ecuación se obtiene al multiplicar ambos términos de la ecuación de Noyes – Whitney por V y haciendo K igual a K_1V .

Comparando estos términos se obtiene la siguiente relación:

$$K = \frac{D}{h} \quad (8)$$



De esta forma, la ecuación de Hixson y Crowell puede ser escrita como:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{KS}{V}(VC_s - W) = k(VC_s - W) \quad (9)$$

En una forma farmacéutica con área expuesta constante estudiada bajo condiciones sink, es posible utilizar esta última ecuación, que después de ser integrada puede escribirse como:

$$W = VC_s(1 - e^{-kt}) \quad (10)$$

Esta ecuación puede ser transformada, aplicando logaritmos decimales en ambos términos:

$$\log(VC_s - W) = \log VC_s - \frac{kt}{2.303} \quad (11)$$

Las siguientes relaciones también pueden expresar el mismo modelo:

$$Q_t = Q_0 e^{-k_1 t} \quad \text{o} \quad \ln \frac{Q_1}{Q_0} = K_1 t \quad \text{o} \quad \ln q_1 = \ln Q_0 K_1 t \quad (12)$$

Considerando logaritmos decimales:

$$\log Q_1 = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (13)$$

Donde Q_1 es la cantidad de fármaco liberado al tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en la disolución y K_1 es la constante de liberación de orden uno. De esta forma, la gráfica que representa al logaritmo decimal de la cantidad de fármaco liberada en función del tiempo debe tener un comportamiento lineal. Un ejemplo de



las formas farmacéuticas que siguen este comportamiento, son aquellas que contienen un fármaco hidrosoluble en una matriz porosa (Mulye, Turco 1995). La cantidad de fármaco liberada en este tipo de sistemas, es proporcional a la cantidad de fármaco remanente, por lo que la cantidad de fármaco liberada disminuirá conforme transcurra el tiempo. (Costa, Sousa 2001).

2.8.3 Modelo de Higuchi

Higuchi desarrolló varios modelos teóricos (1961, 1963) para estudiar la liberación de fármacos solubles e insolubles en agua, incorporados en matrices sólidas y semisólidas. Las expresiones matemáticas fueron establecidas considerando partículas de fármaco dispersas uniformemente en una matriz que se comporta como un medio de difusión.

Para estudiar la disolución a partir de una matriz plana homogénea, la relación matemática es la siguiente:

$$f_1 = Q = \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (14)$$

En donde Q es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t por unidad de área, C es la concentración inicial del fármaco, C_s es la solubilidad del fármaco en el medio y D es la constante de difusión del principio activo en la matriz.

Esta relación fue propuesta inicialmente por Higuchi para describir la disolución de fármacos suspendidos en bases oleosas, pero puede ser aplicada a otras formas farmacéuticas. (Costa, Sousa 2001).

2.8.4 Modelo de Korsmeyer – Peppas

Korsmeyer y colaboradores desarrollaron en 1983 un modelo semiempírico simple, que relaciona exponencialmente la cantidad de fármaco liberado al tiempo transcurrido.



$$f_t = at^n \quad (15)$$

En donde a es una constante que considera la geometría y las características estructurales de la forma farmacéutica, n es el exponente de liberación, indicativo del mecanismo de liberación, y la función de t es M_t/M_∞ (fracción liberada del fármaco). La difusión del fármaco a partir de un sistema polimérico de liberación controlada con forma plana, de grosor δ puede ser representada por:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (16)$$

D es el coeficiente de difusión del fármaco (independiente de la concentración). Si la liberación del fármaco ocurre bajo condiciones sink, pueden ser asumidas las siguientes condiciones iniciales y de frontera.

$$\begin{aligned} t = 0 & \quad -d/2 < x < d/2 & c = c_0 \\ t > 0 & \quad x = \pm d/2 & c = c_0 \end{aligned}$$

Donde c_0 es la concentración inicial del fármaco en el sistema de liberación y c_1 es la concentración del fármaco en la interfase agua – polímero. La solución para la ecuación inicialmente planteada bajo las condiciones establecidas fue propuesta por Crank en 1975. Considerando valores pequeños de t , podemos obtener:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} \left[\pi^{-1/2} + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{erfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad (17)$$



Una expresión simplificada puede obtenerse si se consideran pequeños valores de t , así el segundo término de la ecuación anterior se elimina y se transforma en:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} = at^{1/2} \quad (18)$$

Entonces, si la difusión es el principal mecanismo de liberación de una forma farmacéutica, la gráfica que representa la cantidad de fármaco liberado, en las condiciones establecidas, en función de la raíz cuadrada del tiempo debe tener un comportamiento lineal. Bajo algunas condiciones experimentales, el mecanismo de liberación se desvía de la ecuación de Fick, siguiendo un comportamiento anómalo (no-Fickiano). En estos casos puede utilizarse una ecuación más general:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (19)$$

En 1985 Peppas utilizó el valor n para caracterizar los diferentes mecanismos de liberación, concluyendo que para valores de $n=0.5$ el mecanismo de liberación es la difusión de tipo Fickiano. Para valores de n entre 0.5 y 1.0, o $n=1.0$, el mecanismo principal es la transferencia de masa bajo un comportamiento no Fickiano.

Para la determinación del exponente n solo deben considerarse los puntos de la curva de liberación en donde $M_t/M_\infty < 0.6$. Este modelo se utiliza generalmente para analizar el mecanismo de liberación de formas farmacéuticas poliméricas, cuando se desconoce su comportamiento o cuando más de dos tipos de fenómenos de liberación pueden estar involucrados (Costa, Sousa 2001).



2.9 Estimación del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz

El tamaño es un factor importante al momento de caracterizar a un sistema nanoparticulado, es tal su importancia, que actualmente existe un considerable debate acerca de en donde debe ubicarse el límite entre lo que debe considerarse o no como una nanopartícula. Con la finalidad de solucionar este problema, la Unión Europea, ha publicado la directiva (2011/696/EU) que contiene una serie de guías de cómo debe definirse un nanomaterial (Bhattacharjee 2016). Resalta aquí el párrafo 8 que indica: “Un intervalo definido de tamaños permitirá una interpretación homogénea. El límite inferior propuesto es de 1 nm, mientras que un límite superior de 100 nm es comúnmente aceptado por consenso, pero no existe evidencia científica que respalde la certeza de este valor. Además el uso de un único límite superior puede resultar un factor limitante en la clasificación de los nanomateriales y probablemente un enfoque diferenciado podría resultar más apropiado”.

Por su sencillez y facilidad de adaptación a diversos ambientes, la dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones, es la técnica más utilizada en la determinación del tamaño de partícula hidrodinámico de sistemas nanoparticulados en la comunidad farmacéutica (Bhattacharjee 2016).

El fundamento de esta técnica consiste en el estudio de la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada por las nanopartículas suspendidas en un medio, debido al movimiento Browniano. Estas fluctuaciones son aleatorias y están relacionadas con el coeficiente de translacional de difusión D y también con el diámetro de las partículas. (Cecere et al. 2003).

El fundamento de la técnica se describe a continuación. Cuando un grupo de partículas en un sistema coloidal dispersan un haz de luz incidente, la luz dispersada es detectada en el equipo DLS. El movimiento continuo de las partículas en el seno



de la dispersión causa interferencias y por lo tanto, la intensidad de la luz dispersada fluctúa con el tiempo (Meller 1998). En DLS esta fluctuación en la intensidad de la luz dispersada se correlaciona con intervalos cortos de decaimiento (τ). La intensidad de la función de correlación (ACF) es obtenida a través de la siguiente ecuación, considerando partículas con un tamaño monodisperso (Lorber et al. 2012):

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2Dtq^2\tau} \quad (20)$$

Donde b es una constante dependiente del instrumento y su ajuste óptico, Dt es el coeficiente de difusión translacional y q es el vector de dispersión que puede ser expresado como:

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad (21)$$

Aquí n_0 es el índice de refracción (RI) del disolvente, λ_0 es la longitud de onda en el vacío y θ el ángulo de dispersión.

La intensidad de ACF ($G(\pi)$) es comúnmente representada como $G2(\tau)$ y es una función de $G1(\tau)$ como se describe en la siguiente ecuación:

$$G2(\tau) = 1 + G1(\tau)^2 \quad (22)$$

En la mayoría de los instrumentos que trabajan bajo el principio de DLS se obtiene un diagrama de correlación, en donde RFC (la función de correlación) es graficada en función de τ .

$$RFC = G2(\tau) - 1 = G1(\tau)^2 \quad (23)$$



Esta ecuación demuestra que RFC es dependiente de la función de correlación $G1(\tau)$. Las funciones de autocorrelación [$G2(\tau)$ o $G2(\tau)-1$] son calculados en DLS a través del ajuste de los datos y después D_t es calculado utilizando la primera ecuación presentada en esta sección. Finalmente el radio hidrodinámico de un sólido esférico puede ser calculado utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (24)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann ($1.38064852 \times 10^{-23}$ J/K), T es la temperatura, η es la viscosidad absoluta y R_H es el radio hidrodinámico.

El radio hidrodinámico R_H es el radio de una esfera rígida hipotética que difunde a la misma velocidad que las partículas analizadas por DLS (Bhattacharjee 2016).

2.10 Determinación del potencial Z

Cuando una partícula eléctricamente cargada se dispersa en un medio, se adsorbe en su superficie una serie de iones formando dos capas. La capa más interna consiste primordialmente de contraiones y se le conoce como capa de Stern (Figura 10) (Montes et al. 2014). Después de esta capa el efecto electrostático de la superficie de la partícula cargada primaria disminuye, tal y como lo establece la ley de Debye (Chen et al. 2013). Lo que permite que una capa difusa de iones de cargas iguales y opuestas crezca más allá de la capa de Stern. Esta capa difusa es dinámica y su composición varía en función de diversos factores, por ejemplo, pH, fuerza iónica, concentración, etc. (Figura 10).

Cuando un campo eléctrico es aplicado a la partícula en dispersión, las partículas cargadas se moverán hacia el electrodo con la carga opuesta, a este fenómeno se le conoce como electroforesis (Bhattacharjee 2016).

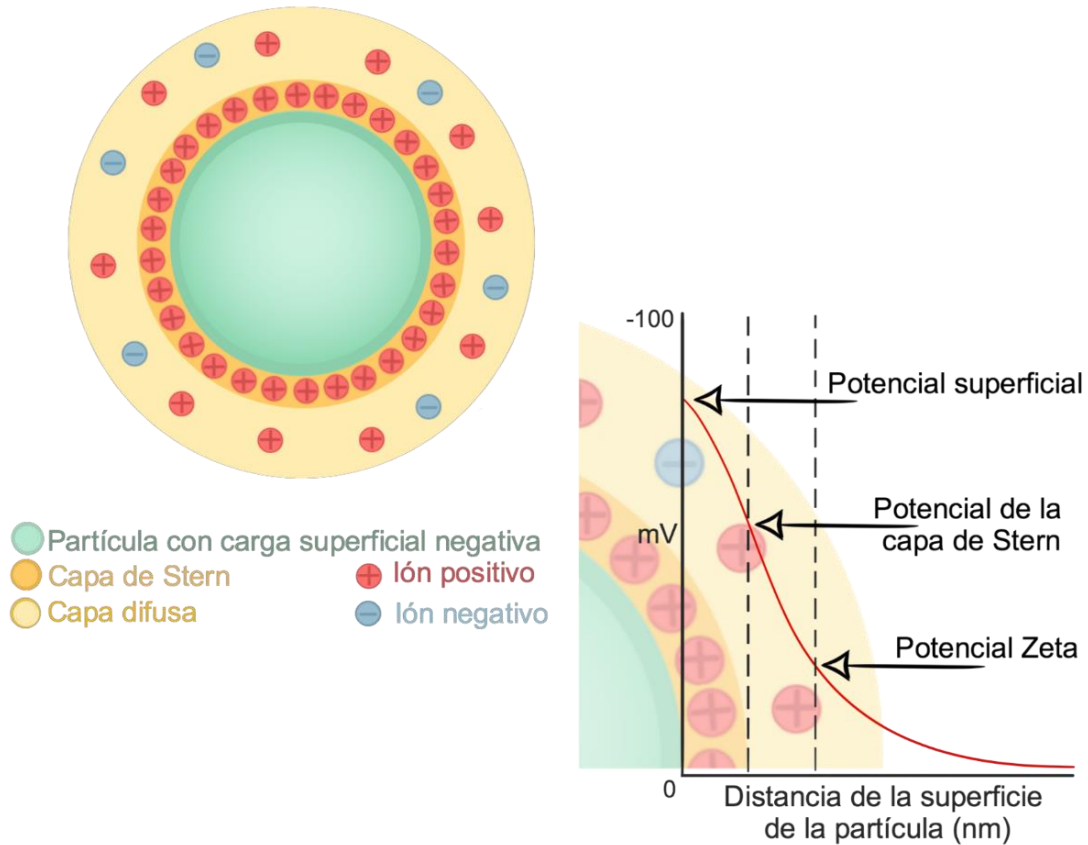


Figura 9. Carga superficial de una partícula coloidal en suspensión

Durante el proceso de electroforesis se presenta un plano hipotético en la capa difusa, que actúa como la interfaz entre las partículas en movimiento y la capa dispersante alrededor de ella. Este plano hipotético se denomina plano de corte o deslizamiento.

El potencial Z (ζ) también conocido como potencial electrocinético, es el potencial existente en el plano de deslizamiento de la partícula coloidal que se mueve bajo el efecto del campo eléctrico (Kaszuba 2010) (Figura 10). El potencial eléctrico de una superficie se define como la cantidad de trabajo que se necesita para traer una unidad de carga positiva desde el infinito a la superficie de la partícula sin ninguna aceleración, por lo que el potencial Z refleja la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica de partículas electroforéticamente móviles y la capa de dispersante



alrededor de ellos en el plano de deslizamiento (Bhattacharjee 2016). El potencial sobre la superficie de la partícula se conoce como el potencial de Nernst (ψ_0) (Vidal-Iglesias et al. 2012).

Como se mencionó anteriormente, la magnitud del campo electrostático disminuye, conforme incrementa la distancia hacia la superficie de la partícula, tal como lo describe la siguiente ecuación:

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (25)$$

En donde ψ es el potencial superficial a la distancia x desde la capa de Stern, ψ_d es el potencial de superficie en la capa de Stern, κ es el parámetro de Debye-Hückel y x es la distancia.

Cuando el plano de deslizamiento está cercano a la proximidad de la capa de Stern $\psi_d \approx \zeta$ y por consiguiente la ecuación anterior puede reescribirse:

$$\psi = \zeta e^{-\kappa x} \quad (26)$$

Es importante mencionar que el parámetro de Debye-Hückel depende de la fuerza iónica del medio, así, la adición de electrolitos conduce a la “compresión” de la doble capa y la disminución del potencial Z .

Debido a su naturaleza el potencial Z no puede ser calculado directamente, pero puede deducirse a partir de la movilidad electroforética de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico. La movilidad electroforética (μ_e) de las partículas puede calcularse:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (27)$$



Aquí, V es la velocidad de la partícula en $\mu\text{m/s}$, E es la fuerza del campo eléctrico en Volts/cm. Con el valor de la movilidad electroforética es posible calcular el potencial Z utilizando la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (28)$$

Donde ε_r es el cociente de la permitividad relativa / la constante dieléctrica, ε_0 es la permitividad en el vacío, $f(Ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad a la temperatura experimental.

Cuando el grosor de la doble capa eléctrica es mucho menor que el radio de la partícula (un efecto que es usualmente observado en partículas grandes, mayores a $1\mu\text{m}$, suspendidas en disoluciones acuosas con concentraciones de sales superiores a 10^{-2}M), la función de Henry toma un valor de 1.5 y la ecuación de Henry se transforma en la ecuación Helmholtz-Smoluchowski (Bhattacharjee 2016).

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta}{\eta} \quad (29)$$

La ecuación de Helmholtz-Smoluchowski es aplicable a la mayoría de las preparaciones farmacéuticas e incluso resulta muy importante en el desarrollo de sistemas nanoestructurados (Thakkar et al. 2011).

Por el contrario, cuando el grosor de la doble capa eléctrica es mucho más grande que la partícula ($\leq 100\text{ nm}$) y la concentración de sales es menor a 10^{-5} M , $f(Ka)$ adquiere un valor de 1 y la ecuación de Henry puede ser modificada como la ecuación de Hückel:



$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{3\eta} \quad (30)$$

La ecuación de Hückel no resulta tan relevante para aplicaciones farmacéuticas y es más utilizada para aplicaciones de la industria de los materiales cerámicos.

La mayoría de los equipos utilizados para deducir el potencial Z de muestras farmacéuticas utilizan la técnica de dispersión de luz electroforética. En ella, se hace incidir un láser sobre las partículas de la muestra bajo un campo electroforético, debido al movimiento generado por el campo, las partículas dispersan la luz en frecuencias diferentes a la frecuencia del láser original, este desplazamiento en la frecuencia es proporcional a la velocidad de las partículas (desplazamiento Doppler). Conociendo la velocidad de las partículas, el potencial Z puede deducirse a partir de las ecuaciones anteriormente presentadas (Bhattacharjee 2016).



3 Hipótesis

Es posible desarrollar una formulación automicroemulsificable que contenga un polímero capaz de generar nanocápsulas *in situ* al interior del cuerpo. Las nanocápsulas así obtenidas exhibirán propiedades físicas y un perfil de liberación característicos de un sistema de tipo reservorio.



4 Justificación

La importancia de este proyecto radica en el desarrollo del primer sistema capaz de generar NC's *in situ* al interior del cuerpo. Una de las principales ventajas de esta propuesta consiste en evitar los pasos de recuperación y purificación directamente relacionados con la agregación y pérdida de la estructura de este tipo de nanopartículas lo que permitiría incrementar su estabilidad.

Adicionalmente el método propuesto es un proceso sencillo que no requiere del uso de disolventes orgánicos, puede ser preparado con equipo normalmente disponible en un área de producción farmacéutica utilizando poca energía y cortos periodos de fabricación.

Resulta importante considerar que existe en el mercado una formulación basada en sistemas automicroemulsificables que contiene ciclosporinas, el Sandimmun neoral®. El Sandimmun se presenta en cápsulas de gelatina, por lo que la formulación desarrollada también podría dosificarse en la misma presentación.

Otras ventajas asociadas a la composición del sistema propuesto son:

- a) Capacidad de mejorar la solubilidad de diversos principios activos.
- b) Adaptarse a fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas.
- c) Funcionar como un potenciador de la permeabilidad por su contenido de tensoactivos y cotensoactivos.
- d) Proteger al fármaco del medio ambiente.
- e) Asegurar la estabilidad de fármacos termosensibles debido a que no se requiere el uso de temperaturas elevadas durante la fabricación.
- f) Modular la velocidad de liberación eligiendo el polímero adecuado.
- g) Controlar el sitio de liberación a través de la selección del polímero.
- h) Funcionalizar el exterior de la NC, adhiriendo a su superficie polímeros bioadhesivos, antígenos, etc.
- i) Disminuir la frecuencia de dosificación.



5 Objetivos

5.1. *Objetivos Generales*

Obtener nanocápsulas cargadas con un fármaco modelo de baja solubilidad (ibuprofeno) *in situ*, a través de un sistema automicroemulsificable-polímero y demostrar la obtención de un sistema de tipo reservorio.

5.2 *Objetivos Particulares*

- a) Seleccionar un fármaco modelo de baja solubilidad, bajo costo y fácil cuantificación para determinar la capacidad de carga y el perfil de liberación de las nanopartículas desarrolladas.
- b) Establecer la metodología de preparación del sistema automicroemulsificable-polímero para la obtención de nanocápsulas *in situ*.
- c) Determinar el tamaño de partícula, el potencial Z y la morfología de las nanopartículas obtenidas a través de una técnica de dispersión dinámica de la luz, un método electroforético y microscopía electrónica de barrido.
- d) Esbozar la estructura interna de las nanopartículas obtenidas mediante la determinación de la densidad a través de centrifugación isopícnica.
- e) Establecer el método analítico para la cuantificación de ibuprofeno en los medios requerido con la finalidad de realizar pruebas de eficiencia de encapsulación y determinar la cinética de liberación *in vitro* de las nanopartículas obtenidas para describir su mecanismo de liberación y relacionarlo con su estructura.



- f) Comparar las propiedades de las nanocápsulas obtenidas por el método propuesto con una formulación análoga de nanoesferas con la finalidad de corroborar la estructura de las nanocápsulas obtenidas.

6 Metodología

La metodología de trabajo puede describirse en cuatro etapas que en conjunto permiten obtener la información necesaria para comprobar que el método propuesto es capaz de producir nanocápsulas *in situ*, Figura 11.

- La etapa “desarrollo de la formulación” consistió en determinar la solubilidad del ibuprofeno en la fase oleosa de la formulación, la compatibilidad entre este fármaco y los excipientes utilizados y el establecimiento de las metodologías de obtención de nanocápsulas y nanoesferas.
- Durante la “caracterización de las NP’s” se obtuvo la información necesaria para describir físicamente a las nanopartículas desarrolladas.
- El objetivo de la etapa “eficiencia de encapsulación” fue evaluar la capacidad de las nanopartículas para retener al fármaco modelo.
- En la última etapa se seleccionó la metodología más adecuada para la evaluación del perfil de liberación de las nanopartículas y este se relacionó con su estructura interna.



Figura 11. Metodología general para la fabricación y caracterización de NC's y NE's *in situ*.

6.1 **Fabricación de las nanopartículas.**

En esta etapa se determinó la solubilidad máxima del ibuprofeno en la fase oleosa de la formulación (triglicérido cáprico-caprílico) y se llevaron a cabo estudios de compatibilidad fármaco-excipientes utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Por otro lado se realizó una modificación a la técnica original de obtención del concentrado SMEDDS-polímero con la finalidad de agilizar el proceso de fabricación de nanocápsulas y se estableció el proceso de fabricación de nanoesferas. Figura 12.



Figura 12. Actividades realizadas durante la etapa de fabricación de las nanopartículas

6.1.1 *Solubilidad del fármaco modelo en la fase oleosa*

La solubilidad del ibuprofeno en la fase oleosa fue determinada para establecer la carga máxima del fármaco en las nanocápsulas. Para ello se adicionó ibuprofeno a saturación a una muestra de volumen conocido de Captex® 355, la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente, tras las cuales se centrifugó a 18000 rpm durante 15 minutos con la finalidad de separar el sólido precipitado del sobrenadante. La cuantificación del fármaco disuelto se llevó

a cabo por espectrofotometría UV a 256.1nm (Cary 50 UV-VIS, VARIAN) utilizando etanol absoluto como disolvente.

6.1.2 Obtención de las nanocápsulas

El método diseñado durante los estudios de maestría para la fabricación de las NC's fue modificado con la finalidad de facilitar la incorporación de los excipientes. El proceso inicia con la adición del polímero a la fase oleosa (compuesta por la disolución del aceite y el ibuprofeno) a una temperatura de $36.0 \pm 2.0^\circ \text{C}$ con agitación continua, (la temperatura de fabricación se seleccionó para abatir la viscosidad de la fase oleosa y el tensoactivo facilitando así su homogenización). Después se adiciona el tensoactivo y una vez que se obtiene una dispersión homogénea se adiciona el cotensoactivo. A partir de este paso el vaso de precipitados se cubre con parafilm para evitar la evaporación del cotensoactivo. A la mezcla anterior se le denominó concentrado SMEDDS-polímero. Para la preparación de las NC's *in situ* 1.0 mL del concentrado se dispersa gota a gota en un volumen de 50.0mL de agua destilada a una temperatura de $36.0 \pm 0.5^\circ \text{C}$ (temperatura corporal) con agitación magnética vigorosa. Este proceso se describe en la Figura 13.

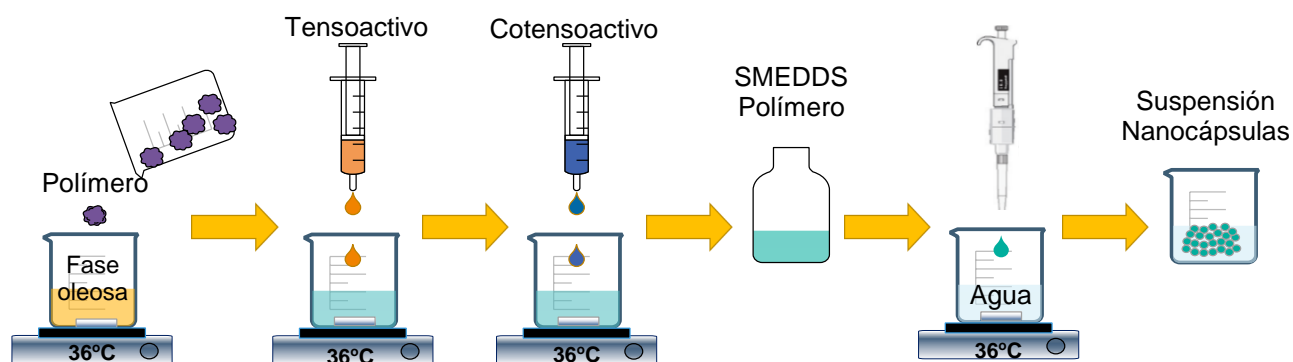


Figura 13. Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y obtención de nanocápsulas *in situ*.



La composición del concentrado SMEDDS-polímero consiste en aceite de ricino polietoxilado (Cremophor® EL) como tensoactivo, 40%; triglicéridos caprílicos/cápricos (Captex® 355) como fase oleosa, 30%; etanol absoluto como cotensoactivo, 30%; un copolímero de metil metacrilato (Eudragit® RL PO) en una proporción de 400 mg de polímero por 1.0 mL de aceite e ibuprofeno en una proporción de un gramo por cada 2.5 mL de aceite.

6.1.3 Obtención de las nanoesferas

Para la obtención de las nanoesferas se eliminó la fase oleosa de la formulación de nanocápsulas, de esta forma se espera que al carecer del aceite, la desolvatación del polímero conduzca a la formación de sistemas de tipo matricial.

La metodología de preparación del concentrado SMEDDS-polímero para la obtención de nanoesferas se describe a continuación:

El ibuprofeno se disuelve en el tensoactivo previamente llevado a una temperatura de $36.0^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$, posteriormente se adiciona el polímero lentamente y con agitación continua. Una vez que se obtiene una dispersión homogénea se adiciona el cotensoactivo, a partir de este paso la mezcla se cubre con parafilm para evitar la evaporación del cotensoactivo. Para la obtención de las nanoesferas in situ, 1 mL del concentrado se dispersa gota a gota con agitación magnética vigorosa en 50.0 mL de agua destilada a $36.0^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, Figura 14.

La composición del concentrado SMEDDS-polímero consiste en aceite de ricino polietoxilado (Cremophor® EL) como tensoactivo, 60% y etanol absoluto como cotensoactivo, 40%. Cabe destacar que la proporción del copolímero de metil metacrilato (Eudragit® RL PO) y del ibuprofeno se mantuvieron iguales a los de la formulación SMEDDS-polímero para la fabricación de nanocápsulas.

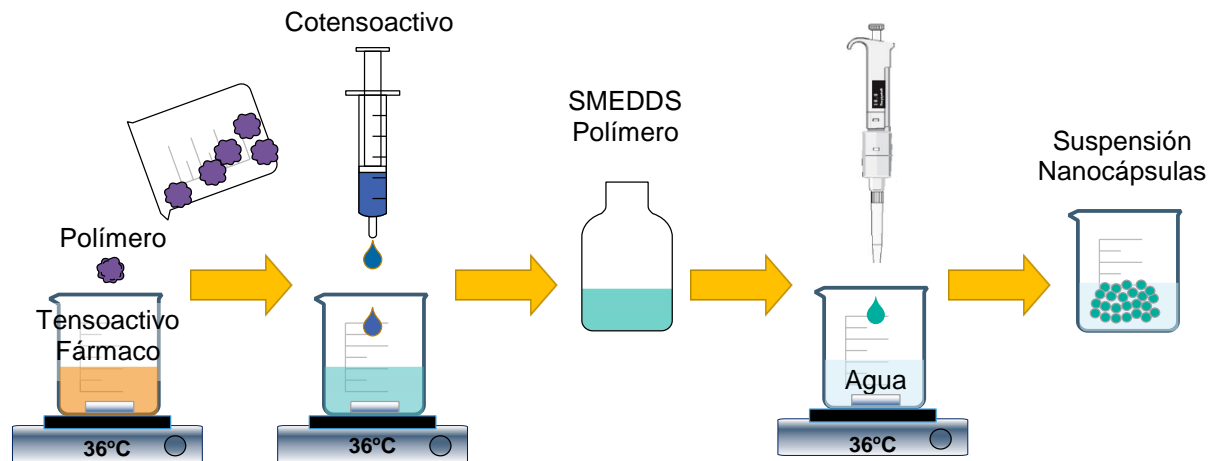


Figura 14. Proceso de fabricación del concentrado SMEDDS-polímero y obtención de nanoesferas in situ.

6.2 Caracterización de las Nanopartículas

La Figura 15 resume las pruebas realizadas durante la caracterización física de las nanopartículas obtenidas. La morfología se determinó por medio de microscopía electrónica de barrido, la densidad a través de un estudio de centrifugación isopícnica, el tamaño de partícula a través de dispersión dinámica de luz y el potencial Z a través de un método electroforético.

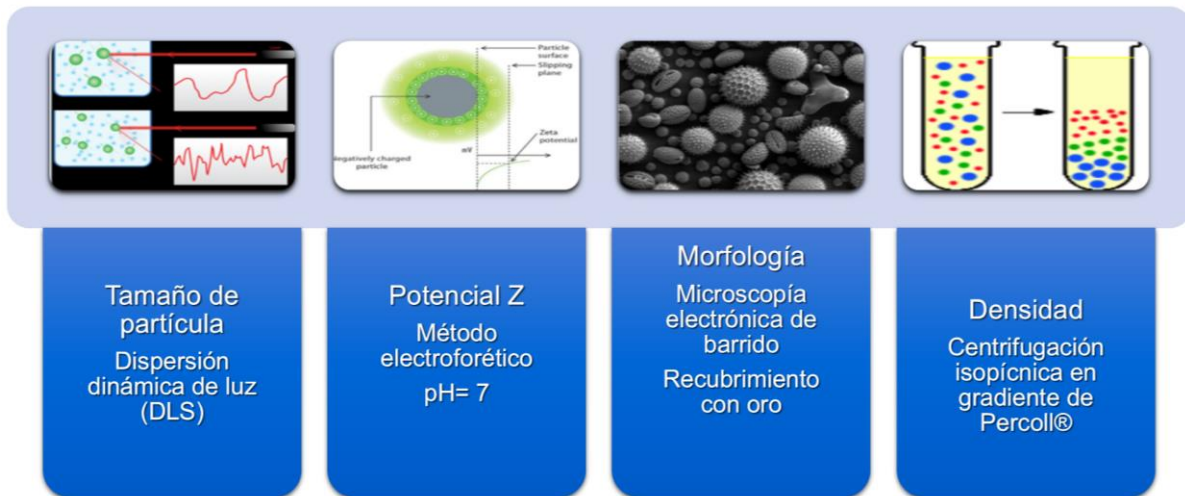


Figura 15. Pruebas realizadas durante la etapa “caracterización de las nanopartículas”

6.2.1 Tamaño de partícula

Una muestra de nanopartículas frescas fue llevada a una dilución 1:50 utilizando agua destilada, su tamaño se determinó empleando el método de dispersión dinámica de luz, (Coulter® N4 Plus; E.U.A.) a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por triplicado.

6.2.2 Potencial Z

El potencial Z se midió a través de la movilidad electroforética de las nanopartículas a un pH= 7, (Nano ZS90, Malvern, UK) utilizando un láser de He-Ne a 633nm. Las



muestras de nanopartículas fueron diluidas con agua destilada antes de ser analizadas por triplicado a temperatura ambiente.

6.2.3 Morfología

Con la finalidad de determinar la morfología externa del sistema las nanocápsulas obtenidas se recuperaron mediante ultracentrifugación (30,000 rpm, 3 horas) y se diluyeron ligeramente antes de colocarse en un portaobjetos. La muestra se secó a temperatura ambiente y se recubrió con una fina capa de oro (aproximadamente de 20nm de espesor) como material de contraste (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japan) para después observarse en el microscopio electrónico de barrido (JEOL® JMS-25SII, Japón).

6.2.4 Densidad

Con el propósito de evaluar la densidad de las nanopartículas se utilizó la técnica de centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sílice coloidal (Percoll®), 50 μ l de cada dispersión de nanopartículas se añadieron a 7 mL de una suspensión de Percoll al 45% v/v en NaCl 0.15 M. Las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm por 3 horas a 5°C en un rotor tipo 90 Ti (ángulo 25°) en una ultracentrífuga preparativa (Optima™ LE-80K, Beckman) generándose así los gradientes de densidad. La altura de cada banda fue medida, con ayuda de un calibrador Vernier, a partir del fondo del tubo y hasta el centro de la banda. Adicionalmente se colocó un cuarto tubo conteniendo 30 μ L de cada uno de marcadores de densidad (Pharmacia Biotech). La densidad de las muestras fue calculada a partir de la curva obtenida al graficar la altura de las bandas obtenidas contra la densidad de los marcadores.

6.3 Eficiencia de encapsulación

En esta etapa se estableció la metodología analítica más adecuada para la cuantificación del ibuprofeno, se realizó la validación parcial de la misma y se llevó a cabo la determinación de la eficiencia de encapsulación. Figura 16.



Figura 16. Pruebas realizadas durante la etapa “eficiencia de encapsulación”

6.3.1 Selección del método analítico

Por ser un método rápido, económico y sencillo se seleccionó la espectrofotometría UV como método de cuantificación. Debido a la baja solubilidad del ibuprofeno en agua, se utilizó etanol 96% RA como disolvente de trabajo. Se utilizó la Guía del Colegio Nacional de QFB como referencia para llevar a cabo el estudio.

6.3.2 Validación parcial del método analítico

Se realizó la validación parcial del método analítico para la cuantificación del porcentaje de fármaco encapsulado a través de espectrofotometría UV, utilizando como disolvente etanol al 96%.



Las pruebas realizadas son:

i) DETERMINACIÓN DE LA LAMBDA MÁXIMA DE ABSORCIÓN DEL IBUPROFENO

Utilizando etanol como disolvente y blanco, se llevó a cabo un barrido de una disolución adecuada de ibuprofeno en un intervalo de 200-400 nm para determinar la lambda máxima de absorción.

i) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Por triplicado, se construyó una curva patrón de 5 puntos considerando el 100% de encapsulación teórica del fármaco como la concentración más alta de la curva. Se calcularon, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada punto, la pendiente de la curva, el coeficiente de correlación de los datos (R^2) y se comprobó la existencia de una correlación significativa entre los parámetros X y Y a través de una prueba de t, con un nivel de confianza $\alpha=0.05$ a dos colas.

ii) PRECISIÓN

Para esta prueba se prepararon 3 muestras por sextuplicado a la concentración del analito a partir de diluciones, el CV debe ser menor o igual al 3%. También se determinó el % de recobro.

iii) EXACTITUD/REPETIBILIDAD

Utilizando diluciones se prepararon por triplicado muestras equivalentes al 50%, 100% y 150% del analito. Se determinó el CV%. El criterio de aceptación indica que los datos deben tener un coeficiente de variación menor o igual al 3% para ser aceptados.

iv) PRECISIÓN INTERMEDIA

Dos analistas diferentes, en dos días diferentes prepararon una muestra por triplicado a la concentración del analito. El criterio de aceptación indica que los datos deben tener un coeficiente de variación menor o igual al 3% para ser aceptados.

6.3.3 Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de encapsulación, un lote de nanocápsulas recién preparado se somete a centrifugación a 35000 rpm durante 2 horas a una temperatura de 5° C. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se recupera la capa de NP's que se seca a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las NP's secas se pesan y disuelven en etanol, la muestra se lleva un volumen final de 25mL y se determina su absorbancia a 265.1 nm. (Figura 17).

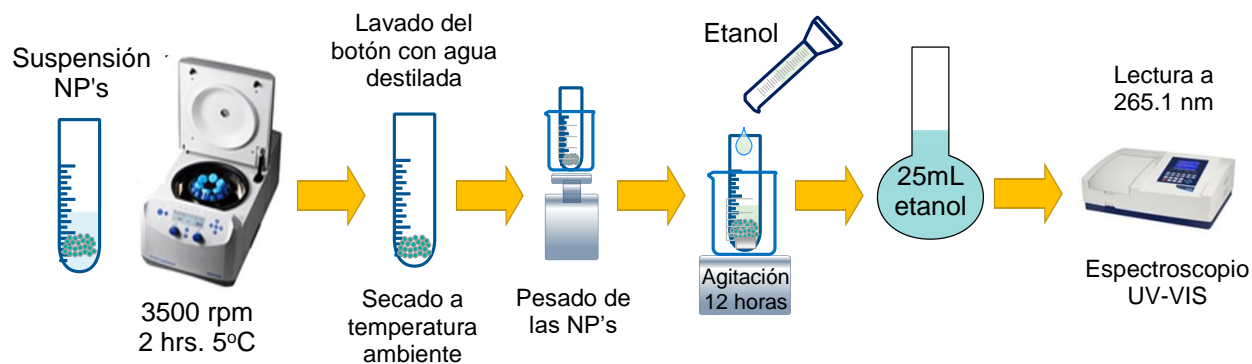


Figura 17. Metodología para la determinación del porcentaje de encapsulación

El porcentaje de encapsulación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Fármaco}_i}{\text{Fármaco}_e} \times 100 \quad (31)$$

En donde Fármaco_i representa la cantidad inicial de ibuprofeno adicionado a la formulación y Fármaco_e , corresponde a la cantidad de fármaco encapsulado.

6.4 Estudios de liberación

Con la finalidad de establecer la metodología más adecuada para llevar a cabo los estudios de liberación se evaluaron las técnicas de ultradialfiltración, filtración y diálisis. Una vez seleccionada la técnica se llevaron a cabo los estudios de liberación. Los datos obtenidos fueron probados en varios modelos de liberación con la finalidad de determinar el mecanismo de liberación de cada sistema para poder llevar a cabo su comparación. (Figura 18).



Figura 18. Pruebas realizadas durante la etapa “estudios de liberación”

6.4.1 Selección de la metodología

Se probaron dos estrategias para la evaluación del perfil de liberación con la finalidad de establecer un método capaz de eliminar a las nanopartículas de las muestras tomadas del medio de liberación. La primera estrategia consistió en adicionar una suspensión de nanopartículas al medio de liberación, 400mL de buffer de fosfatos a pH 7.2, a una temperatura de 37.0 ± 0.5 °C. La agitación fue proporcionada por el aparato de disolución número II (paletas) a una velocidad de

90 rpm (DT1, Optimal Control). Después de una hora se tomaron alícuotas de 3mL que se sometieron a ultradifiltración (Amicon® ultradifiltration, millipore) y a filtración (Puradisc® syringe filter, Whatman).

Finalmente se evaluó la talla de partícula de las muestras tratadas (n=6) con la finalidad de identificar aquellas libres de nanopartículas Figura 19.

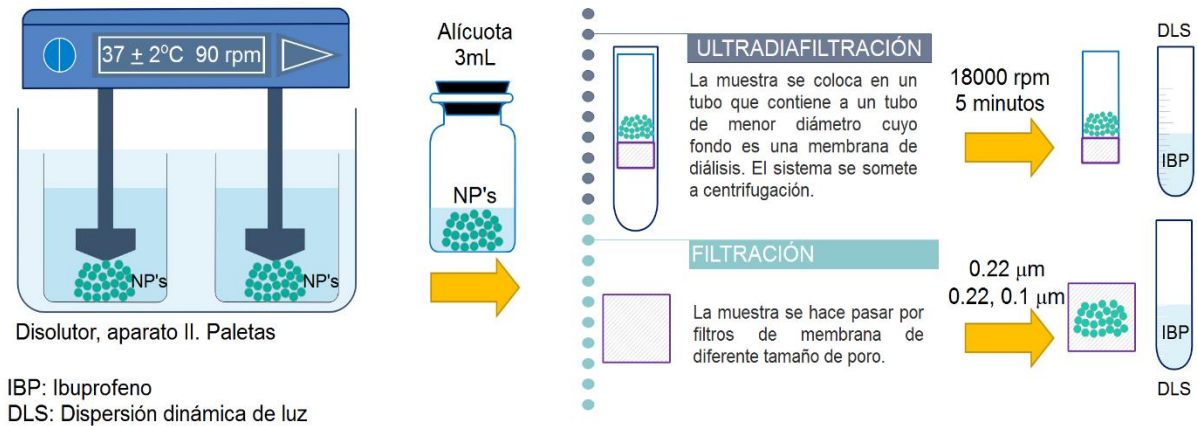


Figura 19. Filtros utilizados para la eliminación de nanopartículas en las muestras correspondientes a los estudios de liberación.

La segunda estrategia consistió en colocar 25 mL de una suspensión de nanopartículas en una bolsa de diálisis (Celulosa, 14000 Da, Sigma Aldrich), la bolsa se sujetó al vástago del aparato I de disolución (canastillas), con ayuda de hilo de nylon. (n=6)

Todo el sistema fue colocado en un vaso con el medio de disolución, 400mL de buffer de fosfatos a pH 7.2 a una temperatura de 37.0 ± 0.5 °C. La agitación fue proporcionada ajustando el vástago de las canastillas a una velocidad de 90 rpm. Tras una hora se tomaron alícuotas de 3mL para determinar la ausencia de nanopartículas en el medio y con ella la eficiencia de la membrana como barrera que evite la salida de las nanopartículas al medio (n=6) (Figura 20).

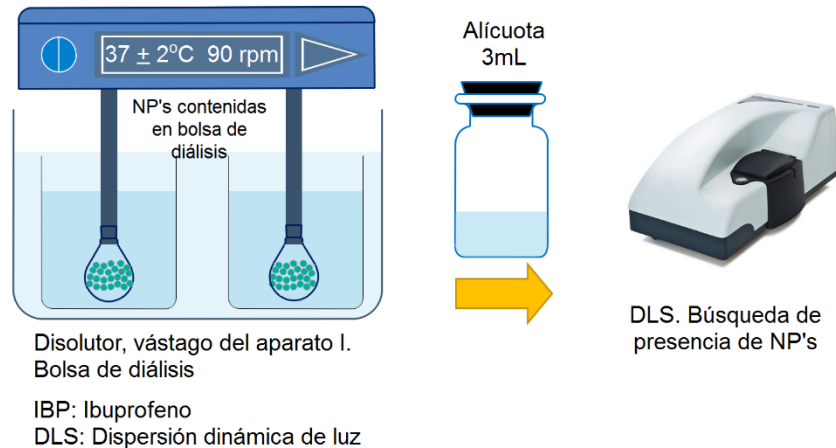


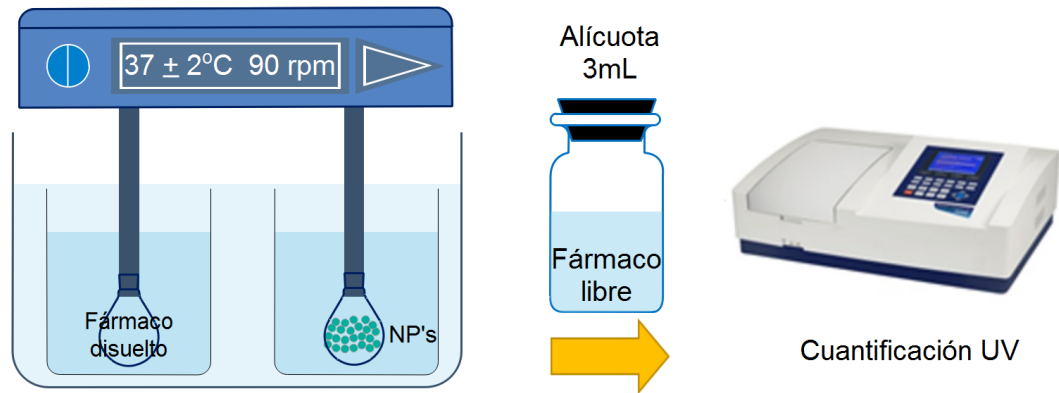
Figura 20. Uso de membrana de diálisis para la eliminación de nanopartículas en las muestras correspondientes a los estudios de liberación.

6.4.2 Evaluación de la membrana de diálisis y estudio de liberación

Para la evaluación de la membrana de diálisis como barrera limitante a la difusión se preparó una disolución de ibuprofeno en buffer fosfatos con una concentración equivalente al contenido teórico de las NPs. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando la metodología de membrana de diálisis previamente descrita. El volumen de muestra fue de 3 mL y el muestreo se realizó a los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos sin reposición de medio.

Para llevar a cabo el estudio de liberación se colocaron 25 mL de una suspensión de nanopartículas (NE's o NC's) en una bolsa de diálisis (Celulosa, 14000 Da, Sigma Aldrich), la bolsa se sujetó al vástago del aparato I de disolución (canastillas), con ayuda de hilo de nylon.

Todo el sistema fue colocado en un vaso con el medio de disolución, 400mL de buffer de fosfatos a pH 7.2 a una temperatura de 37.0 ± 0.5 °C. La agitación fue proporcionada ajustando el vástago de las canastillas a una velocidad de 90 rpm. Se tomaron muestras de 3mL cada 30 minutos durante las dos primeras horas, a partir de ese momento las muestras se tomaron cada hora sin reposición del medio. (Figura 21).



Disolutor, vástago del aparato I.
Bolsa de diálisis
Fármaco disuelto para evaluación de la membrana
NP's para el estudio de liberación
400 mL de medio, 25 mL de muestra

Figura 21. Metodología utilizada para desarrollar la evaluación de la membrana y los estudios de liberación.



7 Resultados y Discusión

7.1 Fabricación de las nanopartículas

7.1.1 *Solubilidad del fármaco modelo en la fase oleosa*

La solubilidad del ibuprofeno en el captex fue de 0.1mg/mL y se estimó a la temperatura de trabajo considerando únicamente la fase oleosa debido a que esta constituye el núcleo de la nanocápsula y se espera que todo el fármaco se disuelva en él. A partir de este dato se estableció la cantidad de aceite a adicionar en la formulación. Este dato permitió posteriormente calcular la eficiencia de encapsulación de la fórmula desarrollada.



7.2 Caracterización de las Nanopartículas

7.2.1 Tamaño de partícula

De acuerdo con los resultados obtenidos de 5 lotes de nanocápsulas preparadas de forma consecutiva, (Tabla 4) las nanocápsulas generadas *in situ* presentan un tamaño de 126.6 ± 40.9 nm. Este resultado puede ser atribuido al mecanismo de formación de las nanocápsulas, en donde el concentrado SMEDDS-polímero da lugar a la formación de los glóbulos de aceite de la microemulsión, que en las pruebas realizadas durante los estudios de maestría presentaron un tamaño aproximado de 79.8 nm. Estos glóbulos de aceite son los responsables de proporcionar un molde para la precipitación del polímero durante la etapa de dilución del concentrado, y la diferencia de tamaño entre el glóbulo de la microemulsión y la nanocápsula puede ser indicativo de la formación de la pared polimérica característica de estos sistemas. Por su parte las nanoesferas poseen una talla de 233.7 ± 36.1 nm (Tabla 4), pues al no contar con una fase oleosa, carecen del molde proporcionado por las gotas de la microemulsión, y por lo tanto su formación depende únicamente de la agitación y la precipitación del polímero durante la difusión del cotensoactivo, dando lugar a partículas de mayor tamaño. Cabe destacar que las nanoesferas han exhibido una gran variabilidad en el tamaño de partícula entre lotes.

Un parámetro que demuestra el grado de dispersión en los tamaños de partícula encontrados es el índice de polidispersión (PDI por sus siglas en inglés), típicamente valores de $PDI < 0.2$ indican distribuciones de tamaño de partícula estrechas (Sawtariea, Caia, Lapitsky 2017), valor que solo se cumple en 3 de los 5 lotes de nanocápsulas (Tabla 4) y en ninguno de los lotes de las nanoesferas (Tabla 4). En particular es más notorio el efecto en las nanoesferas, en donde la formación de los sistemas depende principalmente de la agitación, como se había expuesto anteriormente.



El PDI también puede constituir un factor importante al predecir la estabilidad, pues una distribución estrecha del tamaño de partícula es esencial para prevenir el incremento en el tamaño de partícula debido al efecto de maduración de Ostwald (Muller, Jacobs, Buparvaquone 2002).

Por otro lado los resultados obtenidos a través de la técnica de dispersión dinámica de luz deben ser confirmados por medio de otra técnica, por ejemplo microscopía electrónica, puesto que la dispersión dinámica considera varias simplificaciones que pueden conducir a resultados poco precisos, por ejemplo realiza las mediciones con un láser de ángulo fijo, suponiendo partículas de forma esférica, lo cual no es necesariamente correcto (Li et al. 2016).

Tabla 4. Tamaño de las nanopartículas y nanoesferas obtenido por DLS

Nanocápsulas			Nanoesferas		
Lote	Tamaño	PDI	Lote	Tamaño	PDI
1	131.5	0.294	1	220.3	0.397
2	68.9	0.180	2	257.1	0.833
3	155.8	0.185	3	245.7	0.428
4	171.6	0.256	4	177.4	0.624
5	105	0.163	5	267.8	0.355
Media	126.6		Media	233.7	
Desv. Std.	40.9		Desv. Std.	36.1	

PDI= índice de polidispersión

7.2.2 Potencial Z

Como se estableció inicialmente en el marco teórico, el potencial Z es una medida de la carga superficial de una partícula en relación al medio en que se encuentra dispersa. Este parámetro proporciona información acerca de la estabilidad de las



partículas pues las interacciones electrostáticas que existen entre ellas determinan su propensión a fenómenos de agregación y repulsión. Habitualmente se considera que partículas fuera del rango +30 a -30 mV son más estables (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari 2010).

Las nanocápsulas y las nanoesferas obtenidas presentaron un potencial Z de 37.4 mV y 33.9 mV respectivamente (Tabla 5). Con estos valores, puede considerarse que los sistemas obtenidos serán estables en suspensión, debido a que la alta carga positiva que poseen en su superficie producirá suficiente repulsión entre ellas evitando la formación de agregados. (Yadav, Mishra, Mishra 2012).

En cuanto al valor positivo del potencial Z, este se debe a la presencia de grupos aminos cuaternarios en la estructura del copolímero de metil metacrilato que conforma a la capa externa de las NP's (Patra et al. 2017) y ha sido reportado con anterioridad para otros sistemas nanoparticulados basados en este tipo de polímeros. (Yadav, Mishra, Mishra 2012).

Finalmente este valor positivo de potencial Z imparte propiedades mucoadhesivas a las NP's preparadas puesto que la mucosa gastrointestinal posee una naturaleza aniónica y por lo tanto es afín a compuestos catiónicos. (Ubrich et al. 2005; Bayems, Gurny 1997).

Tabla 5. Potencial Z de las nanopartículas obtenidas

Sistema	Potencial Z (mV)
 Nanocápsulas	37.4
 Nanoesferas	33.9

7.2.3 Morfología

Como se puede observar en las micrografías obtenidas, Figuras 22 y 23, las NC's se presentan como partículas claramente diferenciadas con una forma esférica ligeramente irregular, bordes definidos y un tamaño regular.

Estos resultados constituyen evidencia contundente de la obtención de nanopartículas a través del método propuesto pero no permiten identificar la estructura interna de los sistemas obtenidos, por lo que es necesario realizar la caracterización indirecta de la estructura vesicular de las NP's generadas.

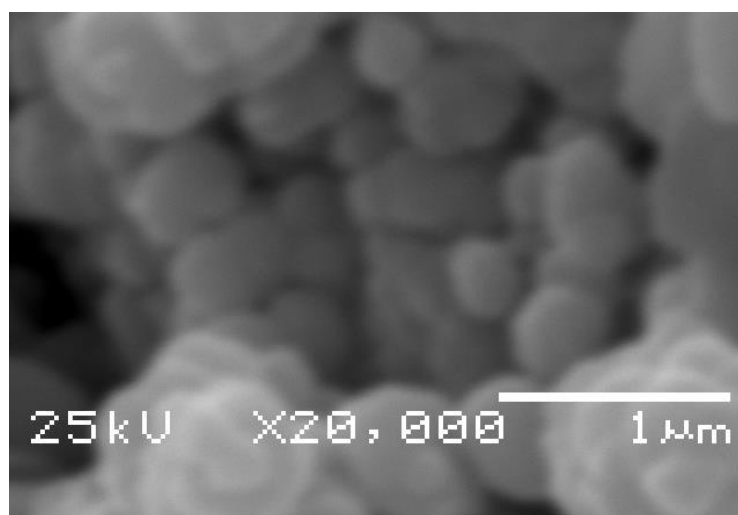


Figura 22. Morfología externa de las nanocápsulas obtenidas 20 000x

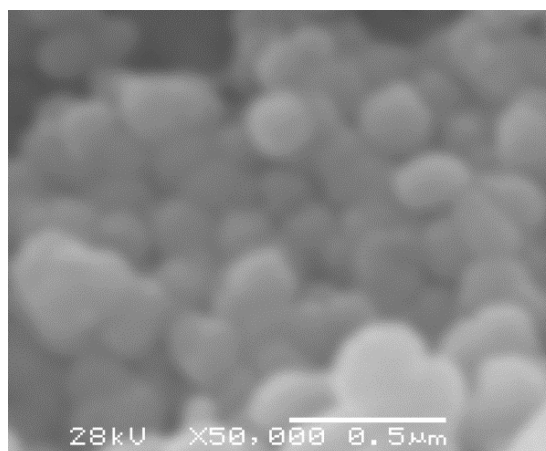


Figura 23. Morfología externa de las nanocápsulas obtenidas 50 000x

Con la finalidad de contar con otra referencia del tamaño de partícula de las NC's obtenidas, la micrografía correspondiente a la Figura 23 fue analizada utilizando el software libre ImageJ® calibrado con las barras de tamaño presentes en la micrografía (Figura 24). Al delimitar las áreas proyectadas de las NC's, el software proporciona el tamaño promedio, el valor mínimo y el máximo obtenidos para la partícula analizada (Tabla 6).

Considerando este análisis, el tamaño de partícula promedio de las NC's es de 240.0 ± 71.0 nm. Este resultado contrasta fuertemente con el obtenido mediante dispersión dinámica de luz (126.6 ± 40.9 nm). Esta gran diferencia puede atribuirse al fundamento y a la técnica de preparación de las muestras.

La dispersión dinámica es una técnica que determina el radio hidrodinámico de las partículas dispersas, mientras que la microscopia mide el área proyectada de las partículas secas y al vacío. En donde el tamaño del diámetro proyectado es un parámetro subjetivo que depende fuertemente de la habilidad del operador del software.

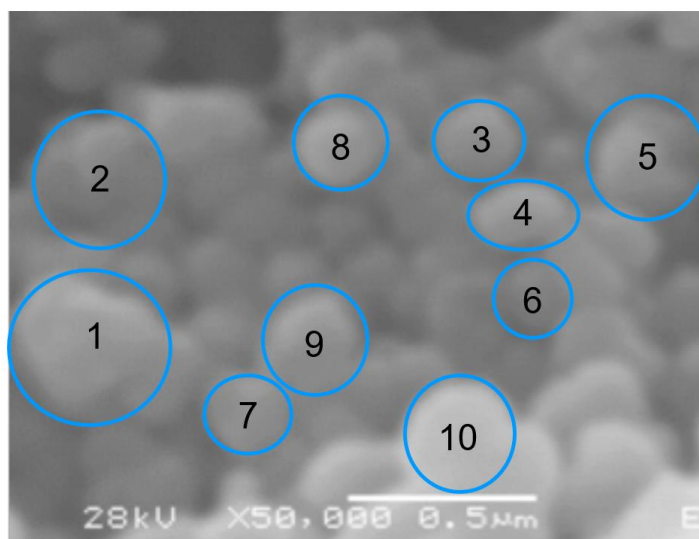


Figura 24. Micrografía tratada con el software libre ImageJ®. Los círculos azules reflejan las áreas proyectadas para las partículas analizadas



Tabla 6. Tamaño de las nanocápsulas utilizando el software libre ImageJ®

Muestra	Diámetro μm	Área min μm^2	Área máx μm^2	Área \bar{X} μm^2
1	0.391	110.343	136.448	124.044
2	0.326	131.097	176.824	153.069
3	0.206	138.288	160.742	150.541
4	0.224	124.835	144.000	139.703
5	0.264	122.511	154.000	141.616
6	0.163	125.043	162.000	147.829
7	0.163	119.000	137.000	127.874
8	0.218	137.000	166.645	146.952
9	0.196	131.517	154.000	145.332
10	0.249	155.571	188.000	180.039
Promedio	0.240	129.520	157.966	145.670
Desv. Std.	0.071	12.4164	16.620	15.284

7.2.4 Densidad

Las nanocápsulas obtenidas poseen una densidad 1.03 g/mL y las nanoesferas una densidad de 1.11 g/mL, (Figura 26, Tabla 7). Esta diferencia puede explicarse considerando la estructura de ambos tipos de nanopartículas y la densidad de sus componentes.

El eudragit posee una densidad de 1.14 g/mL, mientras que el Captex tiene una densidad de 0.94 g/mL (datos proporcionados por los proveedores). La estructura de las nanocápsulas consiste en un núcleo oleoso rodeado de una membrana polimérica, este arreglo permite que su densidad sea baja y el sistema tienda a flotar, en la Figura 26 puede observarse que las nanocápsulas migraron una distancia de 5.75 cm, colocándose en la parte superior de los tubos. La densidad de

las NC's puede considerarse intermedia a la de los componentes individuales que la conforman.

Mientras tanto las nanoesferas, sistemas matriciales constituidos únicamente por el polímero poseen una densidad de 1.11g/mL (Tabla 7) y se ubicaron en el fondo del tubo, con una migración de apenas 0.33cm (Figura 26). La densidad de estas partículas se encuentra muy cercana a la del polímero, comportamiento atribuido a su estructura. Los resultados de esta prueba permiten afirmar que las NP's obtenidas poseen la estructura esperada; vesicular para las nanocápsulas y matricial para las nanoesferas.

La Figura 25 muestra el tubo de referencia con los marcadores de peso molecular en el gradiente de Percoll® generado *in situ* (A), el tubo con las NE's (B) y el tubo con las NC's (C).

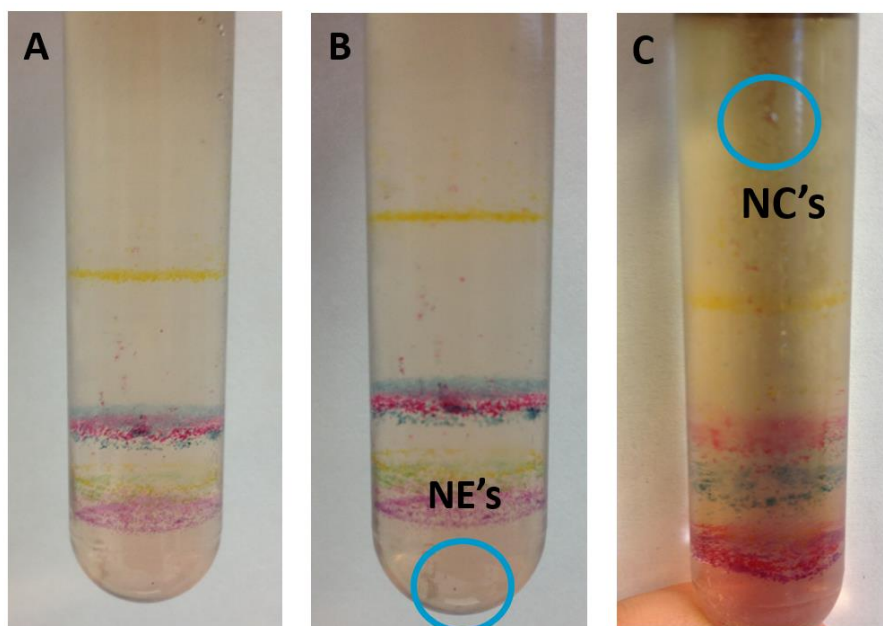


Figura 25. Marcadores de densidad en gradiente de Percoll® conteniendo: A, solo los marcadores; B, marcadores y NE's; C, marcadores y NC's

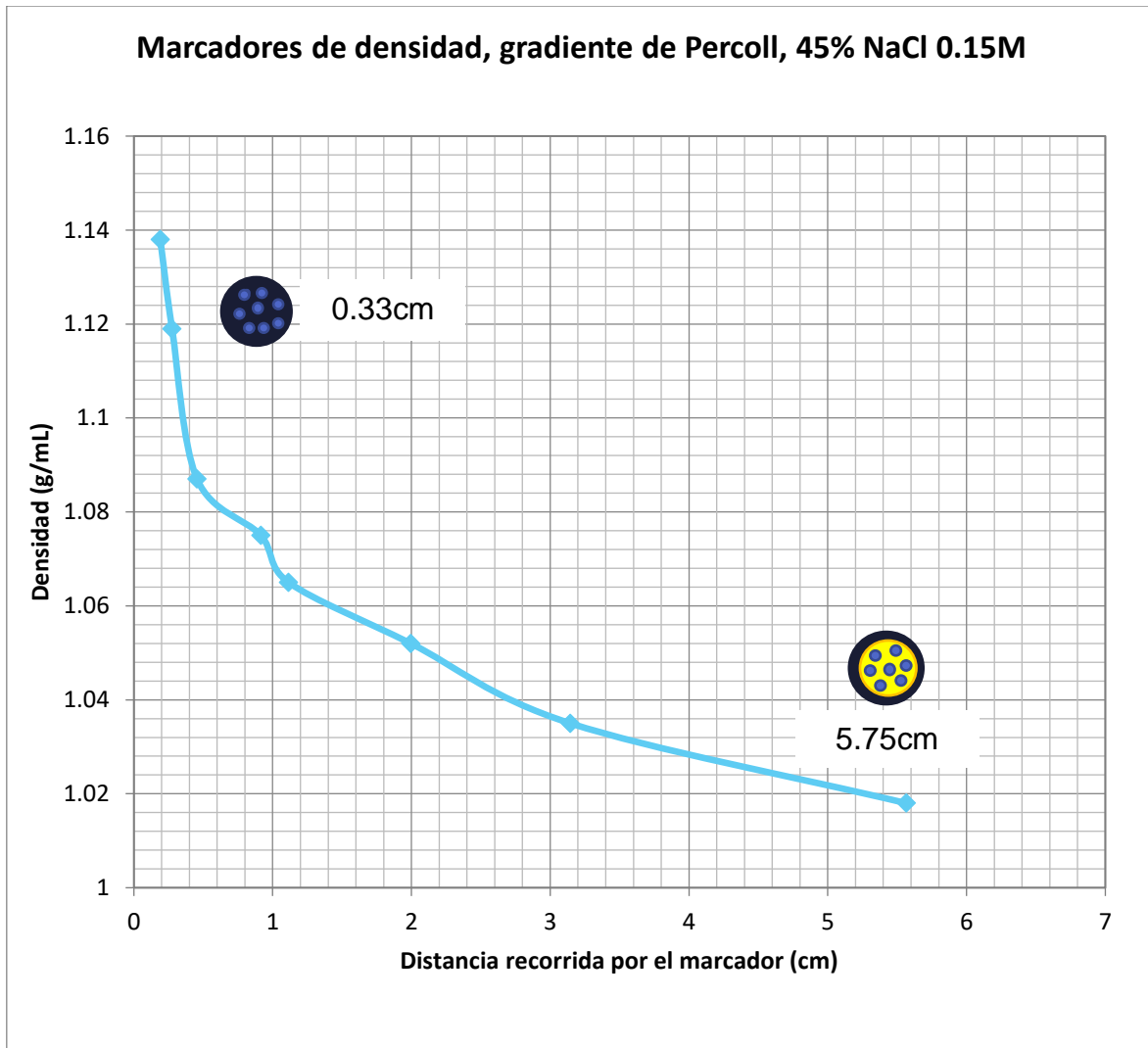


Figura 26. Densidad de las nanocápsulas y nanoesferas obtenida a través de centrifugación isopícnica

Tabla 7. Densidad de las nanopartículas desarrolladas

Nanopartícula	Distancia recorrida (cm)	Densidad estimada (g/mL)
Nanocápsula	5.755	1.03
Nanoesfera	0.331	1.11



7.3 Eficiencia de encapsulación

7.3.1 Selección del método analítico

La 11ª Edición de la farmacopea entre otras fuentes indica que el ibuprofeno puede ser cuantificado a través de espectrofotometría UV. A continuación se muestran los datos obtenidos durante la validación del método analítico desarrollado para la cuantificación de ibuprofeno en los medios de trabajo.

Etanol para el análisis del porcentaje de encapsulación y buffer de fosfatos para los estudios de liberación.

7.3.2 Evaluación del método analítico

a) DETERMINACIÓN DE LA LAMBDA MÁXIMA DE ABSORCIÓN DEL IBUPROFENO.

Considerando que se utilizará etanol para determinar la eficiencia de encapsulación y buffer de fosfatos para llevar a cabo los estudios de liberación, por ser el medio recomendado en la FEUM, se determinó la lambda máxima de absorción del ibuprofeno en ambas condiciones. Para el etanol, la lambda máxima encontrada fue de 265.1nm, mientras que para el buffer de fosfatos fue de 221.0nm. La diferencia en los máximos se debe principalmente a que el grado de ionización del ibuprofeno en ambos disolventes es distinto. Anexo 4.

b) LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se determinó a través de la preparación de las curvas de calibración de ibuprofeno en los medios de trabajo. La desviación estándar, el coeficiente de variación (Tablas 8 y 9) y la R^2 (Figuras 27 y 28) obtenidas indican que el sistema es lineal, por lo tanto se podrá determinar la concentración de muestras que se encuentren en un intervalo de concentraciones que comprenda de



20 a 200 µg/mL utilizando como disolvente etanol y en un intervalo de concentraciones de 2 a 10 µg/mL en buffer de fosfatos a pH 7.5.

Tabla 8. Resultados del estudio de linealidad. Disolvente etanol

[IBP]µg/mL	ABS	ABS	ABS	ABS \bar{X}	Desv. Std.	CV%
200.4	0.2738	0.2746	0.2746	0.2743	0.0004	0.1683
150.3	0.2066	0.2077	0.2052	0.2065	0.0013	0.6068
100.2	0.1397	0.1403	0.1411	0.1404	0.0007	0.5004
50.1	0.0692	0.0675	0.0682	0.0683	0.0009	1.2510
20.04	0.0339	0.0338	0.0343	0.0340	0.0003	0.7782

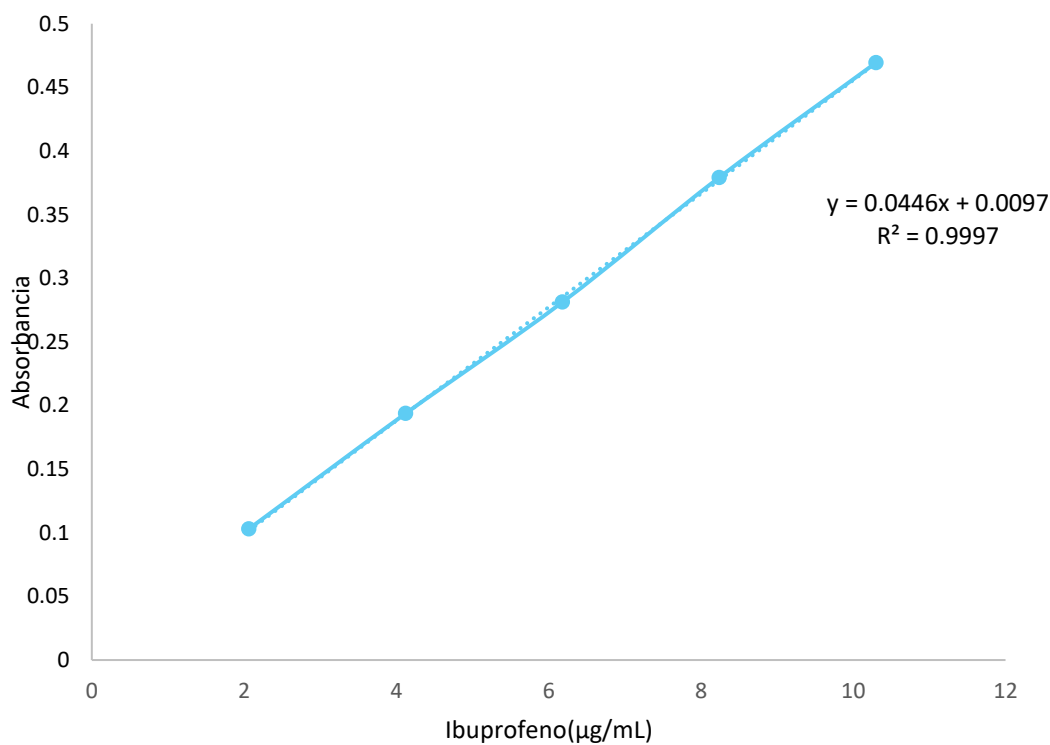


Figura 27. Curva de calibración de ibuprofeno en etanol



Tabla 9. Resultados del estudio de linealidad. Disolvente buffer de fosfatos

[IBP] $\mu\text{g/mL}$	ABS	ABS	ABS	ABS \bar{X}	Desv. Std.	CV%
2.06	0.0943	0.0936	0.0936	0.0938	0.0004	0.4307
4.12	0.1822	0.1819	0.1819	0.1820	0.0002	0.0952
6.18	0.2781	0.2772	0.2775	0.2776	0.0005	0.1651
8.24	0.3747	0.3753	0.3756	0.3752	0.0005	0.1221
10.3	0.4649	0.4645	0.4646	0.4647	0.0002	0.0448

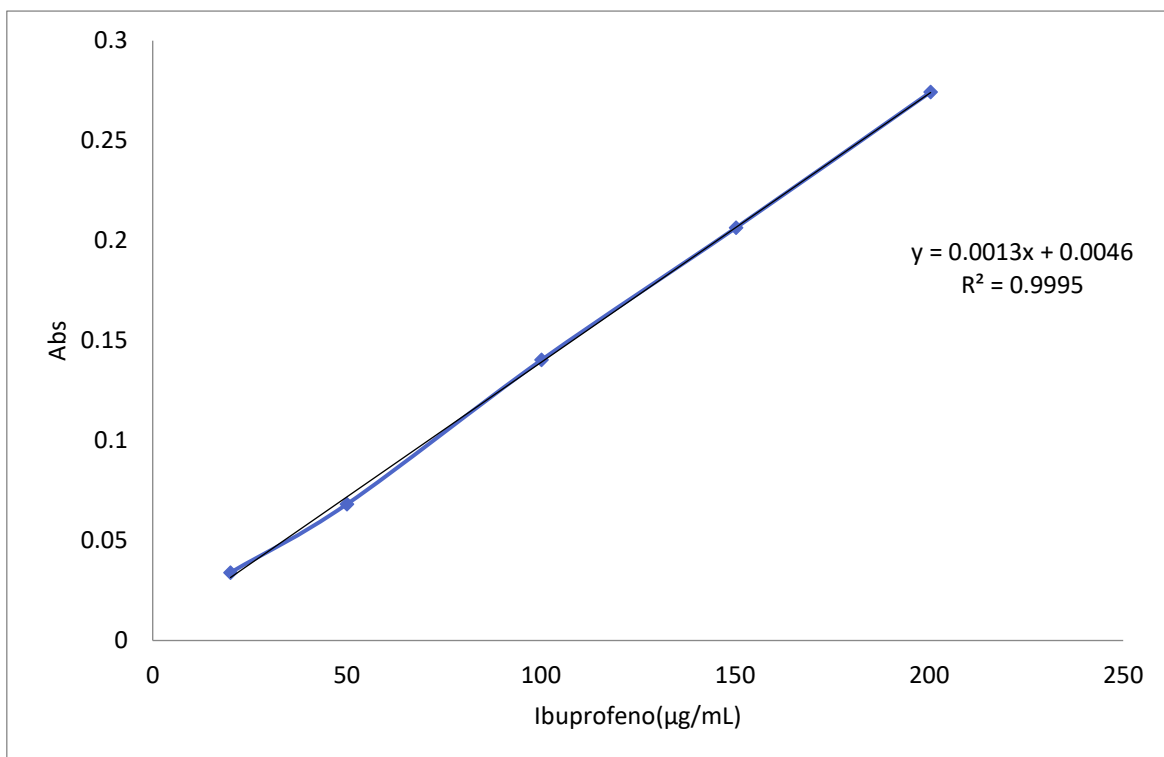


Figura 28. Curva de calibración de ibuprofeno en buffer de fosfatos pH 7.5

c) PRECISIÓN

Los resultados obtenidos en los estudios de precisión indican que los métodos analíticos son precisos utilizando buffer de fosfatos y etanol (Tablas 10 y 11).



Esto implica que múltiples mediciones de preparaciones con la misma concentración proporcionarán valores de absorbancia muy similares entre sí.

Tabla 10. Resultados del estudio de precisión. Disolvente etanol

Repetición	Muestra 1 µg/mL	Muestra 2 µg/mL	Muestra 3 µg/mL
1	144.7	143.8	143.9
2	142.8	141.4	142.2
3	141.0	142.1	142.2
4	141.5	143.9	143.6
5	143.4	141.5	143.1
6	142.7	142.7	141.9
Conc. analito	140.0 µg/mL	Promedio µg/mL	142.7
% Recobro	101.9	Desv. Std.	1.0
		CV%	0.7

Tabla 11. Resultados del estudio de precisión. Disolvente buffer de fosfatos

Repetición	Muestra 1 µg/mL	Muestra 2 µg/mL	Muestra 3 µg/mL
1	7.7	7.6	7.5
2	7.6	7.7	7.3
3	7.7	7.8	7.5
4	8.0	7.3	7.5
5	7.8	7.7	7.5
6	7.7	7.8	7.3



Conc. analito	7.0 µg/mL	Promedio	7.6
% Recobro	108.6	Desv. Std. µg/mL	0.2
		CV%	2.4

d) *EXACTITUD/REPETIBILIDAD*

Los resultados de las Tablas 12 y 13 indican que los métodos analíticos desarrollados utilizando etanol y buffer de fosfatos son exactos y repetibles. Por lo que los análisis obtenidos a través del método desarrollado proporcionarán resultados muy cercanos al resultado real.

Tabla 12. Resultados del estudio de exactitud. Disolvente etanol

%	Muestra 1 µg/mL	Muestra 2 µg/mL	Muestra 3 µg/mL	Prom µg/mL	Desv. Std. µg/mL	CV %
50%	104.4	104.9	104.5	104.6	0.3	0.3
100%	161.0	160.0	161.2	160.7	0.6	0.4
150%	215.2	216.2	215.5	215.6	0.5	0.3

Tabla 13. Resultados del estudio de exactitud. Disolvente buffer de fosfatos

%	Muestra 1 µg/mL	Muestra 2 µg/mL	Muestra 3 µg/mL	Prom µg/mL	Desv. Std. µg/mL	CV %
50%	4.0	4.0	4.0	4.0	0.0	0.3
100%	8.0	7.9	8.0	8.0	0.1	0.7
150%	10.9	11.0	10.9	10.9	0.0	0.4



e) *PRECISIÓN INTERMEDIA*

Las Tablas 14 y 15 permiten observar que los resultados de los estudios de precisión intermedia utilizando etanol y buffer de fosfatos son aceptables.

Tabla 14. Resultados del estudio de precisión intermedia. Disolvente etanol

Muestra	Analista 1	Analista 2
M1 ($\mu\text{g/mL}$)	143.2	147.0
M2 ($\mu\text{g/mL}$)	142.5	146.3
M3 ($\mu\text{g/mL}$)	142.5	145.6
Media	144.5	
Desv. Std.	2.0	
CV%	1.4	

Tabla 15. Resultados del estudio de precisión intermedia.

Disolvente buffer de fosfatos

Muestra	Analista 1	Analista 2
M1 ($\mu\text{g/mL}$)	7.9	7.7
M2 ($\mu\text{g/mL}$)	7.7	7.7
M3 ($\mu\text{g/mL}$)	7.6	7.8
Media	7.7	
Desv. Std.	0.1	
CV%	1.4	

En conjunto los resultados obtenidos en las pruebas analíticas permiten asegurar que el método propuesto para la cuantificación de ibuprofeno es adecuado para los fines propuestos.



7.3.3 *Eficiencia de encapsulación*

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía (Mora-Huertas et. al. 2010) una de las principales ventajas de las nanocápsulas es que presentan una mayor eficiencia de encapsulación que las nanoesferas. Los resultados obtenidos difieren considerablemente de lo reportado pues las nanocápsulas obtenidas presentaron una eficiencia de encapsulación del 31.3% mientras que para las nanoesferas fue de 39.9%. Este resultado puede deberse a dos factores importantes: que aún no se han encontrado las condiciones óptimas para asegurar la mayor eficiencia de encapsulación del principio activo y que el fármaco fue seleccionado como un modelo para una fórmula previamente establecida.

En general, al establecer la fórmula para este tipo de sistemas resulta indispensable seleccionar los componentes en función de las propiedades del principio activo, realizando estudios previos para seleccionar un aceite capaz de solubilizar la mayor cantidad posible del principio activo.



7.4 Estudios de liberación

7.4.1 Selección de la metodología

Considerando los resultados obtenidos (Tablas 16 y 17), las técnicas que involucran diálisis son las más adecuadas para la eliminación de nanopartículas de las muestras durante los estudios de liberación. Sin embargo, el método de diálisis por ultracentrifugación resulta más largo y costoso que el método de membrana de diálisis pues la ultracentrifugación requiere de tubos especiales que no pueden reutilizarse; adicionalmente los tubos deben de prepararse y centrifugarse extendiendo así el tiempo de análisis. Así, por su eficiencia, rapidez y bajo costo, se seleccionó al método de membrana de diálisis para llevar a cabo los estudios de liberación.

Tabla 16. Presencia de nanocápsulas en las muestras de liberación tras diferentes tratamientos

Tratamiento	Talla (nm)	Interpretación
Membrana 0.22	182.0 ± 12.0	Presencia de NC
Membrana 0.22 y 0.1	75.0 ± 15.0	Presencia de NC
Diálisis por centrifugación	12.0 ± 5.0	Ausencia de NC
Diálisis	--	Ausencia de NC

Tabla 17. Presencia de nanoesferas en las muestras de liberación tras diferentes tratamientos

Tratamiento	Talla (nm)	Interpretación
Membrana 0.22	90.0 ± 7.0	Presencia de NE
Membrana 0.22 y 0.1	87.0 ± 9.0	Presencia de NE
Diálisis por centrifugación	5.0 ± 3.0	Ausencia de NE
Diálisis	--	Ausencia de NC



7.4.2 Evaluación de la membrana de diálisis y estudio de liberación

Se evaluó el impacto de la membrana de diálisis en la cinética de liberación de ibuprofeno a partir de las nanopartículas preparadas con la finalidad de demostrar que la membrana no constituye una barrera importante para la difusión de este principio activo. La Figura 29 muestra el perfil de difusión del ibuprofeno libre a través de la membrana así como los perfiles de liberación promedio a partir de las nanopartículas evaluadas.

En la Figura 29, puede observarse que la difusión del fármaco libre a través de la membrana (en verde) es mayor al 70% en 2 horas. Lo que sugiere que la membrana de diálisis no representa una resistencia significativa a la difusión del fármaco, por lo que puede considerarse que la membrana de diálisis utilizada es apropiada para la prueba de liberación (Moreno-Bautista, Tam 2012).

Con la finalidad de identificar el mecanismo de liberación de cada tipo de nanopartícula y relacionarlo con su estructura, los datos obtenidos fueron tratados utilizando el software DD Solver (Zhang et al 2010). Los modelos utilizados fueron el de orden cero, en donde se considera que la velocidad de liberación del fármaco es independiente del tiempo; primer orden, en el que la velocidad de liberación depende de la cantidad remanente de fármaco al interior del sistema; Higuchi, que implica que el principal mecanismo de liberación es la difusión; Korsmeyer-Peppas que a través de su coeficiente “n” nos permite conocer el mecanismo de liberación principal y Hixson-Crowell, que considera la difusión en función del área superficial y la concentración, asume que la agitación es la misma en toda la partícula (Figuras 30 y 31).

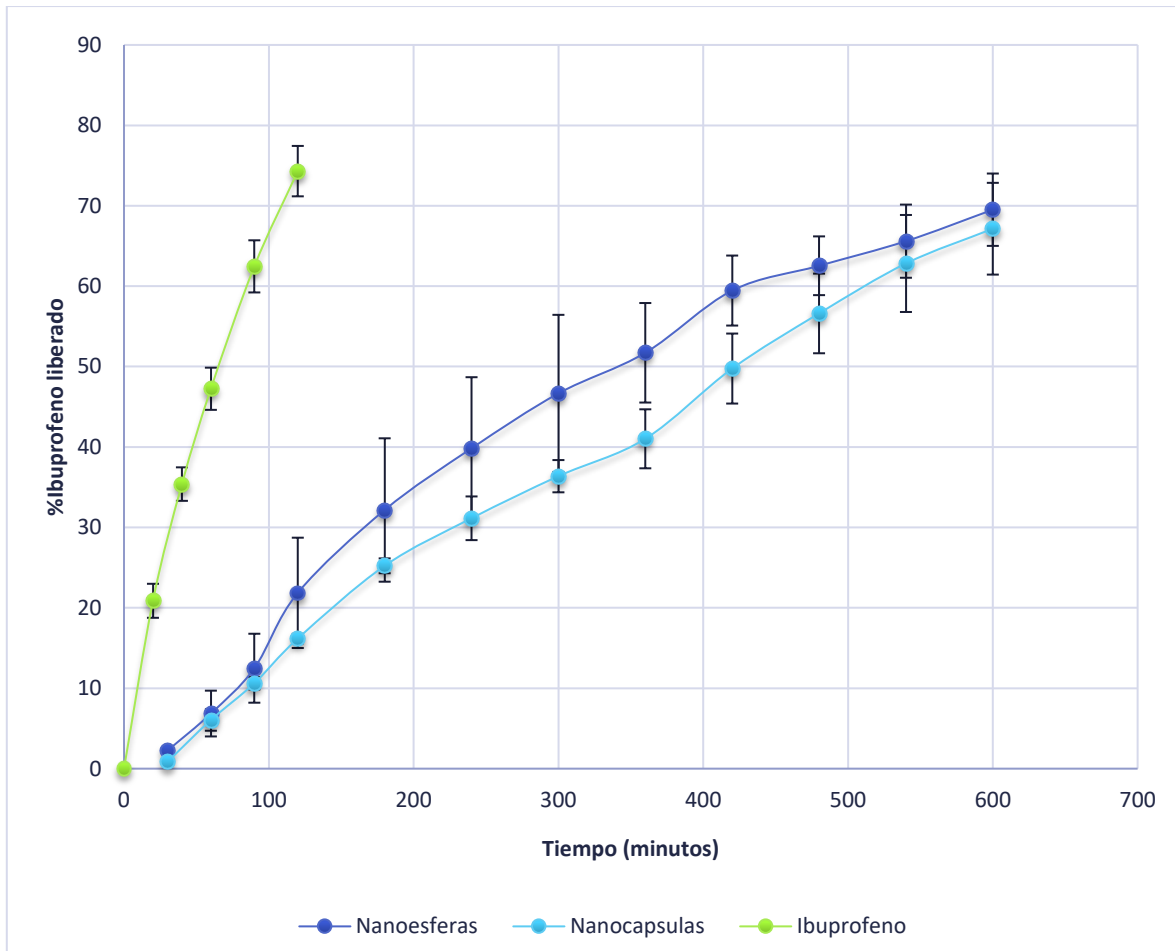


Figura 29. Perfiles de liberación promedio de las nanoesferas, nanocápsulas e ibuprofeno libre utilizando el método de membrana de diálisis

Como puede observarse en las Tablas 18 y 19, los datos obtenidos presentan un mejor ajuste al modelo de Korsmeyer Peppas. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para identificar el mecanismo de liberación de sistemas nanoparticulados a través del coeficiente “n”, por lo que este valor fue calculado para ambos sistemas. Las nanocápsulas presentan una coeficiente n de 1.0006, de acuerdo a la ecuación de Korsmeyer Peppas este valor indicia que el sistema presenta una liberación de orden cero, este comportamiento coincide con las observaciones realizadas con anterioridad por Calvo et al. En las nanocápsulas (sistemas de tipo reservorio) el



núcleo oleoso que contiene al fármaco se encuentra rodeado por una capa polimérica en donde la liberación ocurre por medio de la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica. Si la membrana mantiene un grosor constante, el camino de difusión también se mantiene constante, por lo que la liberación del fármaco sigue una cinética de orden cero.

Las nanoesferas presentan un coeficiente n con un valor de 0.7179. De acuerdo a la ecuación de Korsmeyer Peppas, este valor indica que el mecanismo de liberación es una difusión anómala (no Fickiana) que se refiere a una liberación controlada por 3 mecanismo principales; erosión e hinchamiento del polímero y difusión del fármaco (Peppas 1985), relacionados a sistemas de tipo matricial en donde la distancia a la que difunde el fármaco se hace mayor conforme avanza el tiempo. Estos resultados permiten confirmar la estructura propuesta para las nanopartículas desarrolladas.

Tabla 18. Evaluación estadística del ajuste de los datos obtenidos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer- Peppas	Higuchi	Hixon Crowell
Parámetros	k_0	k_1	k_1, n	k_H	k_{HC}
R_ajus	0.8838	0.9627	<u>0.9790</u>	0.9428	0.9501
AIC	85.6530	73.3387	<u>66.5638</u>	77.4493	75.1633
MSC	2.0323	2.9796	<u>3.5007</u>	2.6634	2.8392

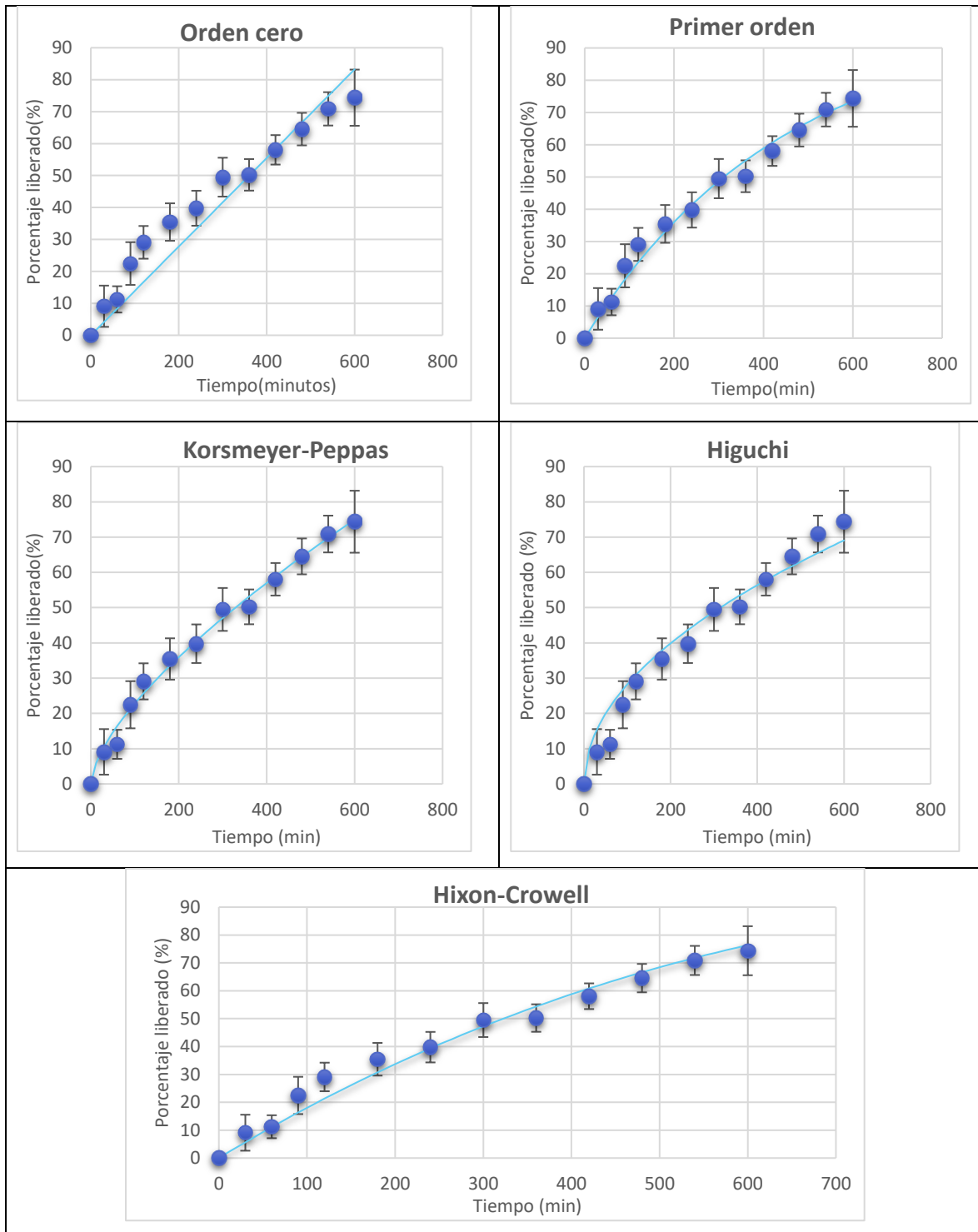


Figura 30. Ajuste de los datos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos. N=6

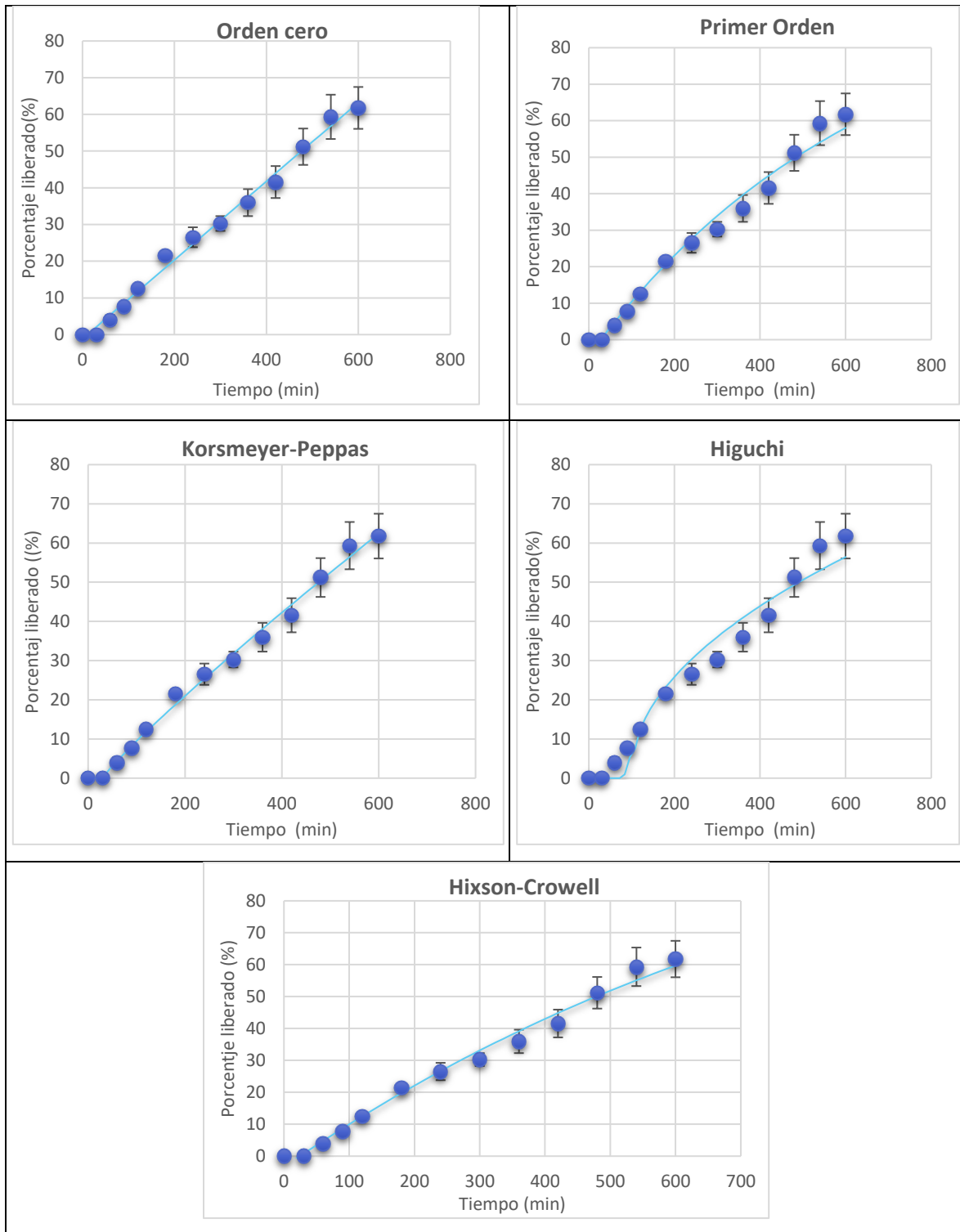


Figura 31. Ajuste de los datos de liberación de nanocápsulas a los modelos propuestos. N=6



Tabla 19. Evaluación estadística del ajuste de los datos obtenidos de liberación de nanoesferas a los modelos propuestos

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer- Peppas	Higuchi	Hixon Crowell
Parámetros	k_0	k_1	k_1, n	k_H	k_{HC}
R_ajus	0.9909	0.9787	0.9919	0.9613	0.9857
AIC	51.0322	64.9942	53.3192	72.9000	59.9793
MSC	4.1971	3.3539	4.2520	2.7458	3.7397



8 Conclusiones

- a) Se seleccionó una formulación químicamente compatible para la obtención de nanocápsulas *in situ*.
- b) Se estableció la metodología de preparación del sistema automicroemulsificable-polímero para la obtención de nanocápsulas *in situ*.
- c) Las nanocápsulas obtenidas poseen una morfología esférica, una talla de 126.6 ± 40.9 nm y un potencial Z de 37.4 mV que indica que no tenderán a formar aglomerados.
- d) La densidad de las nanocápsulas obtenidas en comparación con las nanoesferas nos indica que la estructura interna de cada sistema corresponde a la propuesta; vesicular para las nanocápsulas y matricial para las nanoesferas.
- e) Se estableció el método analítico para la cuantificación de ibuprofeno en los medios requeridos.
- f) Los resultados de las pruebas de encapsulación no muestran diferencias entre los sistemas obtenidos, sin embargo, este puede deberse a que la formulación no fue expresamente diseñada para ese fármaco modelo.
- g) Los resultados de los estudios cinéticos confirman la estructura vesicular de las nanocápsulas y la estructura matricial de las nanoesferas.
- h) La metodología propuesta permite obtener nanocápsulas *in situ* a través de un método rápido y sencillo que no requiere pasos de purificación, conservando la morfología y funcionalidad de las NC's obtenidas.



9 Perspectivas

Debido a los resultados obtenidos en el presente trabajo, resulta atractivo realizar estudios que permitan verificar que este tipo de sistemas puedan ser utilizados con otros fármacos y otros excipientes enfocados a mejorar las propiedades biofarmacéuticas de fármacos de baja solubilidad y vida media corta.

Otra perspectiva importante es explorar otros métodos de evaluación de la liberación *in vitro* con la finalidad de determinar de manera precisa la cantidad de fármaco libre al inicio del estudio de liberación, utilizando métodos analíticos más sensibles.

Proponemos además explorar las aplicaciones del método propuesto en otras vías de administración además de la oral.

Finalmente resultaría indispensable elegir un modelo animal adecuado para llevar a cabo pruebas de caracterización y liberación *in vivo*, pues a pesar de que los resultados *in vitro* son alentadores es indispensable determinar el desempeño del sistema propuesto en un sistema biológico.



10 Referencias

1. Aiache, J., Aoyagi, N., Bashaw, D., Brown, C., Brown, W., Burgess, D., Qureshi, S. (2003). FIP / AAPS Guidelines to Dissolution / in Vitro Release Testing of Novel / Special Dosage Forms. *AAPS PharmSciTech*, 4(1), 1–10.
2. Attwood, D., Mallon, C., Taylor, C.J. (1992). Phase studies of oil-in water phospholipid microemulsions, *Int. J. Pharm.* 84.
3. Attwood, D., Microemulsion. In J. Kreuter (Ed.) *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York (1994) pp 31-71.
4. Bayems, V., Gurny, R. (1997). Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. *Pharma Acta Helv.* 72(4): 191 –202.
5. Bhattacharjee, S. (2016) 'DLS and zeta potential - What they are and what they are not?', *J. Control. Release.* 235. 337–351.
6. Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E., (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 24(1):67-75.
7. Brittain, G.H., Florey, K., Forcier, G., Mazzo, D., Wozniak, T..Analytical profiles of drug substances and excipients. *Academia Press*, (2001), Vol. 15, USA. Chapter ibuprofen.
8. Burgess, D. J., Crommelin, D. J. A., Hussain, A. S., & Chen, M.-L. (2004). Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS Pharm. Sci.*, 6(1): 100–11.
9. Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 85, (5) 530–536.



10. Cecere, D., Bruno, A., Minutolo, P., & D'Alessio, A. (2003). DLS measurements on nanoparticles produced in laminar premixed flames. *Synth. Met.*, 139(3): 653–656.
11. Charcosset, C., Limayem, I., & Fessi, H. (2004). The membrane emulsification process - A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79(3): 209–218.
12. Chen, Z., Wei, Z., Chen, Y., Dames, C. (2013). Anisotropic Debye model for the thermal boundary conductance. *Phys. Rev. B. Condens. Matter.* 87.
13. Chien, Y.W. (1989). Rate-control Drug Delivery Systems: Controlled Release vs. Sustained Release. *Med. Prog. Technol.* 15(1-2):21-26.
14. Couvreur, P., Couarraze, G., Devissaguet, J-P., Puisieux F. (1996). Nanoparticles: preparation and characterization. *Microencapsulation Methods and Industrial Applications* Edited by Benita, S. Marcel Dekker E.U
15. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., (2002). Nanocapsule Technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 19 (2) 99-134.
16. D'Souza, S. S., & DeLuca, P. P. (2006). Methods to assess in Vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm. Res.* 23(3): 460–474.
17. D'Souza, S. (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Adv. Pharm.* 1-13.
18. Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., & Préat, V. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *J. Controlled Release*, 133(1), 11–17.
19. Date, A. A., & Nagarsenker, M. S. (2007). Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil. *Int. J. Pharm.*, 329(1–2): 166–172.



20. Elnaggar, Y. S. R., El-Massik, M. A., & Abdallah, O. Y. (2009). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization. *Int. J. Pharm.*, 380(1–2), 133–141.
21. Fattal, E. (2000). *Nanoparticles as Drug Delivery Systems. Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology.* Wise D.L. CRC Press. New York. 1864-1867.
22. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1):1–4.
23. Fisher, O.Z., Khademhosseini, A., Peppas, N.A., (2010). *Drug Delivery: Nanoscale Devices, Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* Elsevier Ltd. 1-9.
24. Heng, Desmond; Cutler, David J.; Chan, Hak-Kim; Yun, Jimmy; Raper, J. A. (2008). What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharm. Res.* 25(7): 1696–1701.
25. Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F.M., Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques, *Philos. Transact. A Math. PhysEng. Sci.* 368, 4439–4451.
26. Khedekar, K. ; S. M. (2013). A review: Self emulsifying drug delivery system. *Int J Pharm Sci Res.* 4(12): 4494–4507.
27. Khoo, S., Humberstone, A. J., Porter, C. J. H., Edwards, G. A., & Charman, W. N. (1998). Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int. J. Pharm.* 167: 155–164.
28. Kilfoyle, B. E., Sheihet, L., Zhang, Z., Laohoo, M., Kohn, J., & Michniak-kohn, B. B. (2012). Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *J. Controlled Release.* 163(1): 18–24.
29. Kilic, A. C.; Capan, Y.; Vural, I.; Gursoy, N. R.; Dalkara, T.; Cuine, A.; Hincal, A. A. (2005). Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the



- targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. *J. Microencapsulation*, 22(6): 633–641.
30. Kim, Y. H., Fluckiger, L., Ho, M., Lartaud-idjouadiene, I., Atkinson, J., Maincent, P., Cedex, N. (1997). The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded nanoparticles in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 120: 399–404.
 31. Krämer, S. D. (1999). Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2(9).
 32. Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York, (1994). Ch. Nanoparticles.
 33. Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. 75: 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
 34. Kwon, H., Lee, J., Choi, S., & Jang, Y. (2001). Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification – diffusion method, 182: 123–130.
 35. Lamola, A.A., Turro, N.J. (Ed.), *Spectroscopy*. In: *The Science of Photobiology*. Plenum Press, New York. (1977) pp. 27-61.
 36. Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2012). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 175–193.
 37. Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, 65, 259–269.
 38. Levy, M. Y., Benita, S., (1990). Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int. J. Pharm.* 66 (1–3) 29–37.
 39. Li, L., Yang, K., Li, W., Wang, W., Guo, W., & Xia, M. (2016). *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. A recursive regularization algorithm for estimating the particle size distribution from multiangle dynamic light



- scattering measurements. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 178, 244–254.
40. Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, H., Yuan, W., Gao, X. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Controlled Release*, 71(2): 203–211.
41. Liu, Y., Zhang, P., Feng, N., Zhang, X., Wu, S., & Zhao, J. (2009). Optimization and in situ intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int. J. Pharm.*, 365, 136–142.
42. Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 40(6): 372–382.
43. Maikala, R. V. (2010). Modified Beer's Law - historical perspectives and relevance in near-infrared monitoring of optical properties of human tissue. *Int J Ind Ergon*. 40(2): 125–134.
44. Mäntele, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochim. Acta, Part A*. 173:965–968.
45. Martinez, M. N., Rathbone, M. J., Burgess, D., & Huynh, M. (2010). Breakout session summary from AAPS/CRS joint workshop on critical variables in the in vitro and in vivo performance of parenteral sustained release products. *J. Controlled Release*. 142(1): 2–7.
46. Martinez, M., Rathbone, M., Burgess, D., & Huynh, M. (2008). In vitro and in vivo considerations associated with parenteral sustained release products: A review based upon information presented and points expressed at the 2007 Controlled Release Society Annual Meeting. *J. Controlled Release*. 129(2): 79–87.
47. McCulloch, I., Moore, D. J. (2009). *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. In *Science and Technology* (Second, pp. 7548–7550). Elsevier.
48. McGinity, J.W., O'Donnell, P.B. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev*. Oct 13; 28(1):25-42.



49. Meller, A., Bar-Ziv, R., Tlusty, T., Moses, E., Stavans, J., & Safran, S. A. (1998). Localized Dynamic Light Scattering: A New Approach to Dynamic Measurements in Optical Microscopy. *Biophys. J.* 74(3): 1541–1548.
50. Montes Ruiz-Cabello, F. J., Trefalt, G., Maroni, P., & Borkovec, M. (2014). Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Phys. Rev. E: Stat. Phys.* 90(1): 1–10.
51. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 385(1–2): 113–142.
52. Moreno-Bautista, G., & Tam, K. C. (2011). Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids Surf., A.* 389(1–3): 299–303.
53. Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., & Yang, X. (2008). Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 353(1–2): 270–276.
54. Müller, R. H., & Jacobs, C. (2002). Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: Preparation, optimisation and long-term stability. *Int. J. Pharm.*, 237(1–2), 151–161.
55. Muthu, M. S.; Singh, S. (2009). Poly (D, L-lactide) nanosuspensions of risperidone for parenteral delivery: formulation and in-vitro evaluation. *Curr Drug Deliv.* 6(1): 62–68.
56. Nigade, P.M., Patil, S.L., Tiwari, S.S. (2012). Self emulsifying drug delivery system (SEDDS): a review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2(2):42-52.
57. O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28(1): 25–42.
58. Osborne, D. W.; Middleton, C. A.; Rogers, R. L. (2007). Alcohol-free microemulsions. *J. Dispersion Sci. Technol.* 9(4): 415–423.



59. Ostrovsky, Mikhail V; Good, R. J. (1984). Mechanism of microemulsion formation in systems with low interfacial tension: Occurrence, properties, and behavior of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 102(1): 206–226.
60. Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: NBM.* 8(2), 147–166.
61. Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F., & Charman, W. N. (2008). Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(6): 673–691.
62. Pouton, C. W. (1985). Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *Int. J. Pharm.* 27(2–3): 335–348.
63. Pouton, C. W. (1997). Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25(1): 47–58.
64. Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2002). Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 244(1–2): 105–115.
65. Prasad R., Kurt E., Geckeler. A. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress Pol. Sci.* (36) 7, 887–913.
66. Patra, C.N., Priya, R., Swain, S., Jena, G.K., Panigrahi K.C., Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *F Jour Pharm Sci.* 3, 33–45.
67. Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36(7): 887–913.
68. Reh binder, P.; Lichtman, V. (1957). Effect of surface active media on strains and rupture in solids. *Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity.* 3: 563–582.
69. Road, G., & Park, E. B. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 368: 4439–4451.



70. Ruschak, K. J., & Miller, C. A. (1972). Spontaneous Emulsification in Ternary Systems with Mass Transfer. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 11(4), 534–540.
71. Sagitani, Hiromichi; Friberg, S. E. (2010). Microemulsion systems with a nonionic surfactant. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 1(2), 151–164.
72. Sanna, V., Roggio, A. M., Siliani, S., Piccinini, M., Marceddu, S., Mariani, A., & Sechi, M. (2012). Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *Int. J. Nanomed.* 7, 5501–5516.
73. Sawtarie, N., Cai, Y., & Lapitsky, Y. (2017). Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids Surf. B*, 157, 110–117.
74. Siewert, M., Dressman, J., Brown, C.K., Shah, V.P., (2003). “FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms,” *AAPS Pharm. Sci. Tech.* vol. 4.
75. Souza, S. D. (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014(304757):1–1
76. Swarbrick J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Informa Healthcare. 3a ed. USA, 2007, 1652-1662.
77. Thakkar, H., Nangesh, J., Parmar, M., Patel, D. (2011). Formulation and characterization of lipid-based drug delivery system of raloxifene-microemulsion and selfmicroemulsifying drug delivery system, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3, 442–448.
78. Tapash, K.G., Bhaskara, R.J., *Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutic*. 2004 *Oral Controlled Release Solid Dosage Forms* CRC Press, E.U. 333-340.
79. Tenjarla, S., *Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications*, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 16 (1999) 461-521.



80. Ubrich, N., Schmidt, C., Bodemier, R., Hoffman, M., Maincent, P. (2005) Oral evaluation in rabbits of cyclosporine-loaded Eudragit RD or RL nanoparticles. *Int J Pharm.* 288 (1): 169–175.
81. Uprit, S., Kumar Sahu, R., Roy, A., & Pare, A. (2013). Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. *Saudi Pharm J.* 21(4): 379–385.
82. Vauthier, C., Schmidt, C. and Couvreur, P. (1999). Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation, *J. Nanopart. Res.*, 1(3), p. 411–418.
83. Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 26(5): 1025–1058.
84. Venier-Julienne, M. C., & Benoît, J. P. (1996). Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharmaceutica Acta Helveticae.* 71(2): 121–128.
85. Venkatraman, S., Davar, N., Chester, A., Kleiner, L., 2000. An overview of Controlled Release Systems. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology.* Wise D.L. CRC Press. New York 431-463.
86. Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Van Dijck, A., Mensch, J., Brewster, M. E. (2003). Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J. Controlled Release.* 92(3): 349–360.
87. Vidal-Iglesias, F. J., Solla-Gullón, J., Rodes, A., Herrero, E., & Aldaz, A. (2012). Understanding the Nernst equation and other electrochemical concepts: An easy experimental approach for students. *J. Chem. Educ.* 89(7): 936–939.
88. Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., & Boyd, B. J. (2012). Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Deliv Transl Res* 2(4): 284–292.



89. Wattanasin, P., Saetear, P., Wilairat, P., Nacapricha, D., & Teerasong, S. (2015). Zone fluidics for measurement of octanol-water partition coefficient of drugs. *Anal. Chim. Acta.* 860: 1–7.
90. Xu, X., Khan, M. A., & Burgess, D. J. (2012). A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.*, 426(1–2), 211–218.
91. Yadav, S. K., Mishra, S., & Mishra, B. (2012). Eudragit-based nanosuspension of poorly water-soluble drug: formulation and in vitro-in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 13(4): 1031–44.
92. Yan, G. P., Zong, R. F., Li, L., Fu, T., Liu, F., & Yu, X. H. (2010). Anticancer drug-loaded nanospheres based on biodegradable amphiphilic ϵ -Caprolactone and carbonate copolymers. *Pharm. Res.* 27(12), 2743–2752.
93. Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* 12(3), 263–271.
94. Zhang, Y., Wang, H., Li, C., Sun, B., Wang, Y., Wang, S., & Gao, C. (2014). A novel three-dimensional large-pore mesoporous carbon matrix as a potential nanovehicle for the fast release of the poorly water-soluble drug, celecoxib. *Pharm. Res.*, 31(4), 1059–1070.
95. Zhao, Y., Wang, C., Chow, A. H. L., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. *Int. J. Pharm.*, 383(1–2), 170–177.



11 Anexos

ANEXO 1

Propiedades del Copolímero de metilmetacrílate Eudragit® RLPO

El eudragit® RLPO es un copolímero de etil acrilato, metilmetacrilato y bajo contenido del éster del ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario. Estos grupos de amonio cuaternario se encuentran presentes en su forma de sal y permiten que el polímero sea ligeramente permeable.

El Eudragit RLPO se presenta en forma de un polvo blanco con un ligero olor característico, su peso molecular de 32000 g/mol y su temperatura de transición vítrea es de 70° C. Este polímero se utiliza principalmente para preparar sistemas de liberación modificada, solo o en combinación con otros polímeros, por ejemplo el eudragit RL100.

La revisión presentada por Patra y colaboradores en 2017 indica que el Eudragit RLPO se ha utilizado primordialmente en sistemas de liberación sostenida que van desde nanopartículas, tabletas mucoadhesivas, parches y dispersiones sólidas.

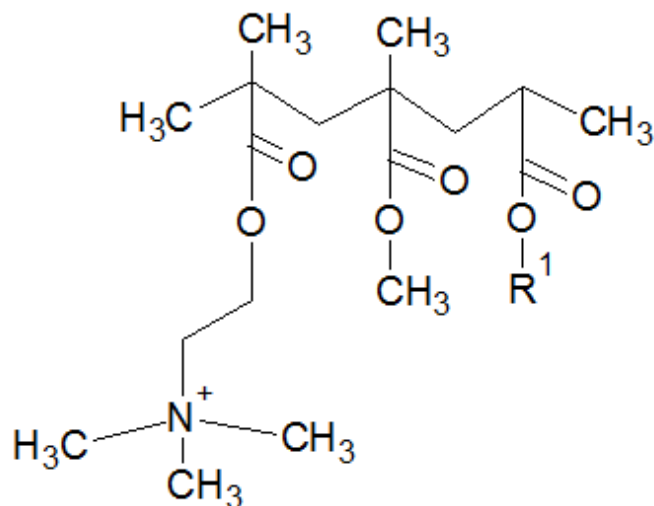
Tabla de características generales del Eudragit® RLPO

PARÁMETRO	VALOR
Nombre IUPAC	Poli (cloruro de etil acrilato-co-metilmetacrilato-co-triamonioetil metacrilato)
CAS	33434-24-1 (RL y RS)
Radio de los monómeros	(EA:MM:TAM) 1:2:0.2



Peso molecular promedio	32000-150000 g/mol
Fabricante	Evonic
Nombre comercial	Eudragit RLPO
Densidad a 20° C	0.816-0.836 g/cm ³
Color	Blanco lechoso a ligeramente amarillo
Índice de refracción a 20° C	1.380-1.385
Olor	Característico, ligero
Temperatura de transición vítrea	70° C
Propiedades	Baja permeabilidad, Hinchamiento pH independiente Liberación pH independiente Alta flexibilidad

Adaptado de Wypych G. *Handbook of polymers*. ChemTech Publishing. 2ª ed. Toronto, Canadá, 2016, 86.



Estructura del Eudragit® RLPO, ACD Chem Sketch.



ANEXO 2

Propiedades del triglicérido de cadena media Gliceril Tricaprilato/Caprato Captex® 355

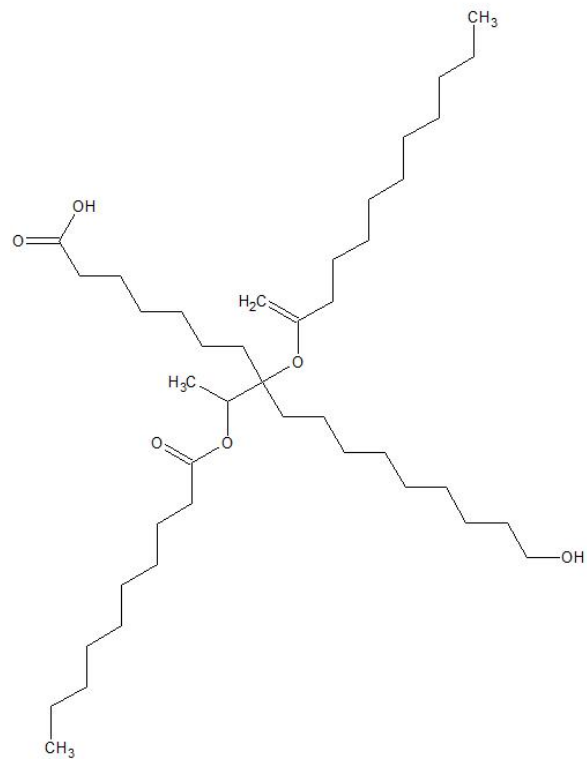
Los ésteres de cadena media pueden ser utilizados en la fabricación de diversas formas farmacéuticas, como vehículos o modificadores de la viscosidad.

Estos ésteres son casi inodoros, insípidos y poseen coloraciones tenues.

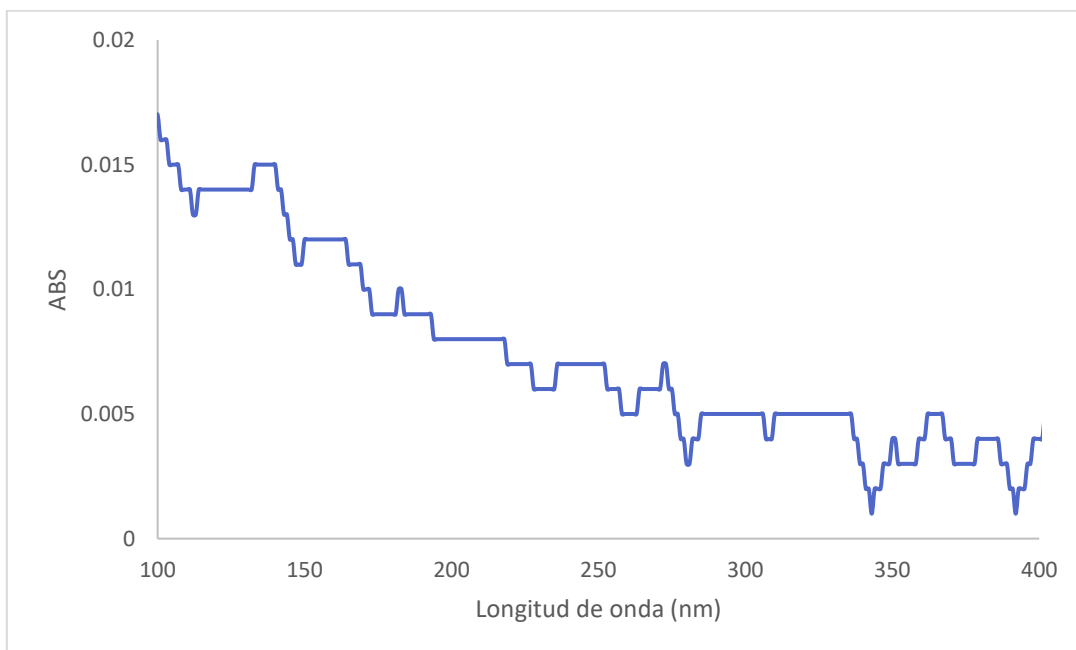
Tabla de características generales del Captex® 355

PARÁMETRO	VALOR
Nombre IUPAC	2-Hidroxi-1-[(octanoiloxi)metil]etil decanoato
CAS	65381-09-1
Log P	3.965
Peso molecular	408.57 g/mol
Fabricante	Abitec
Nombre comercial	Captex® 355
Densidad a 25° C	0.92-0.96 g/mL
Color	Amarillo claro/Translúcido
Viscosidad a 20° C	25 – 33 cP
Olor	Característico
Índice de saponificación	325 – 340 (mg KOH/g)
Índice de refracción	1.461
Punto de ebullición	456°C a 760 mmHg

*Adaptado de: Abitec (2006) Captex® 355 (en línea). Disponible en:
<<http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Tech-Data-Sheet-Captex-355-food-grade-preservative-free-MCT.pdf>> [20 de Agosto de 2017].*

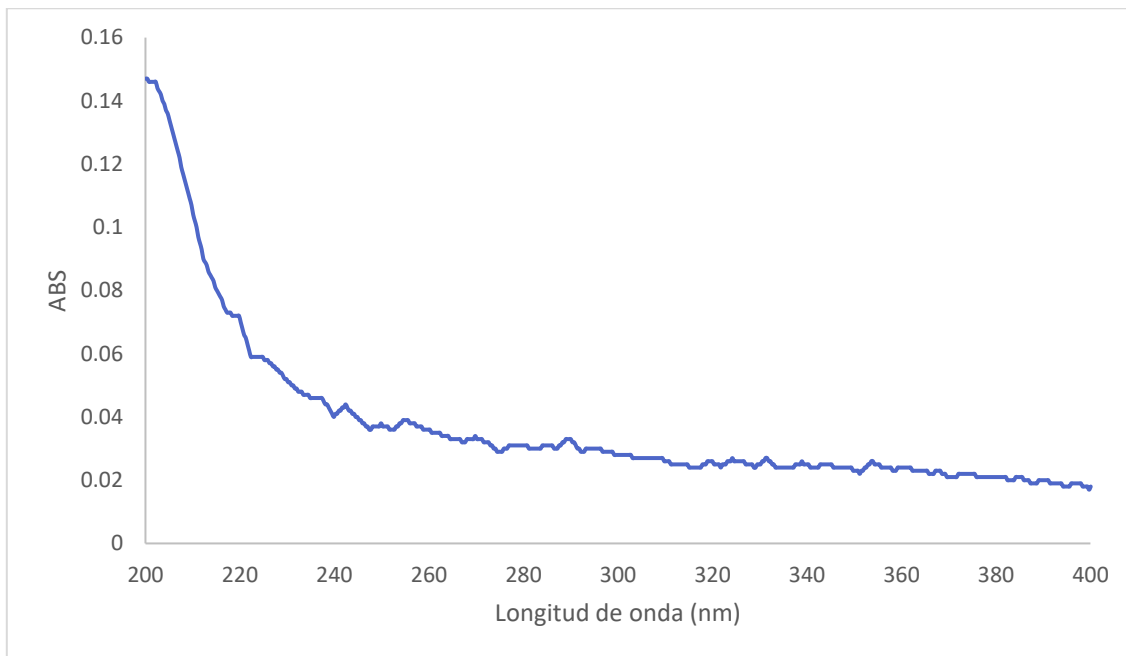


Estructura del Captex® 355, ACD Chem Sketch.





Espectro de absorción UV del Captex® 355 en etanol. Barrido de 200-400 nm



Espectro de absorción UV del Captex® 355 en agua. Barrido de 200-400 nm.



ANEXO 3

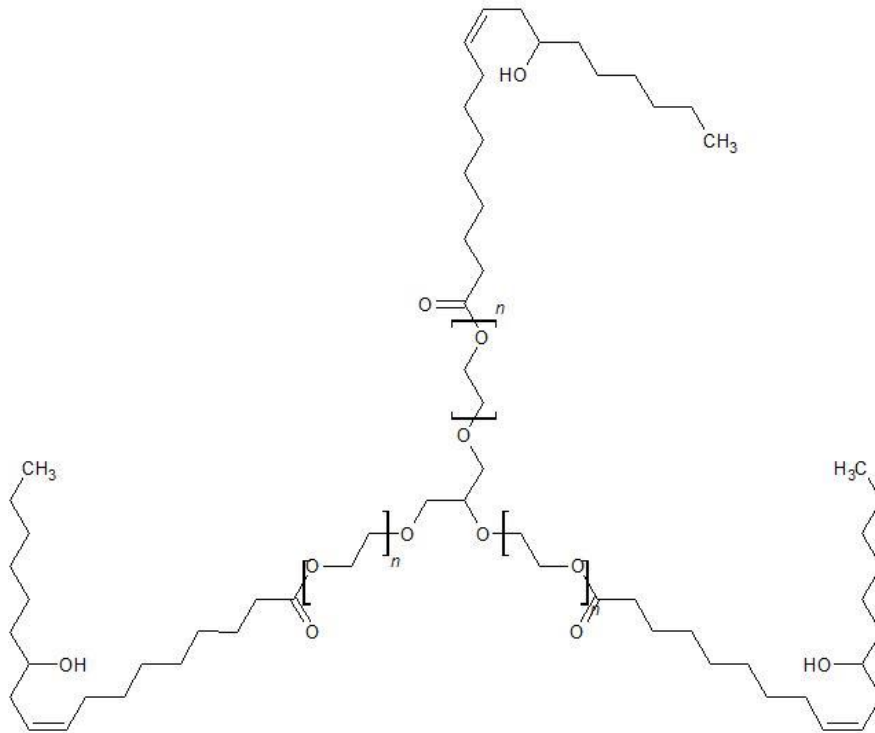
Propiedades del aceite de ricino polioxil hidrogenado Cremophor® EL/Kolliphor® EL

El aceite de ricino polioxil hidrogenado, es un tensoactivo no iónico obtenido mediante la reacción del aceite de ricino con óxido de etileno. Es un líquido oleoso claro, de color amarillo claro a temperaturas mayores de 26° C. Posee un ligero olor característico. Se utiliza usualmente en la producción de formulaciones semisólidas y líquidas de compuestos hidrofóbicos.

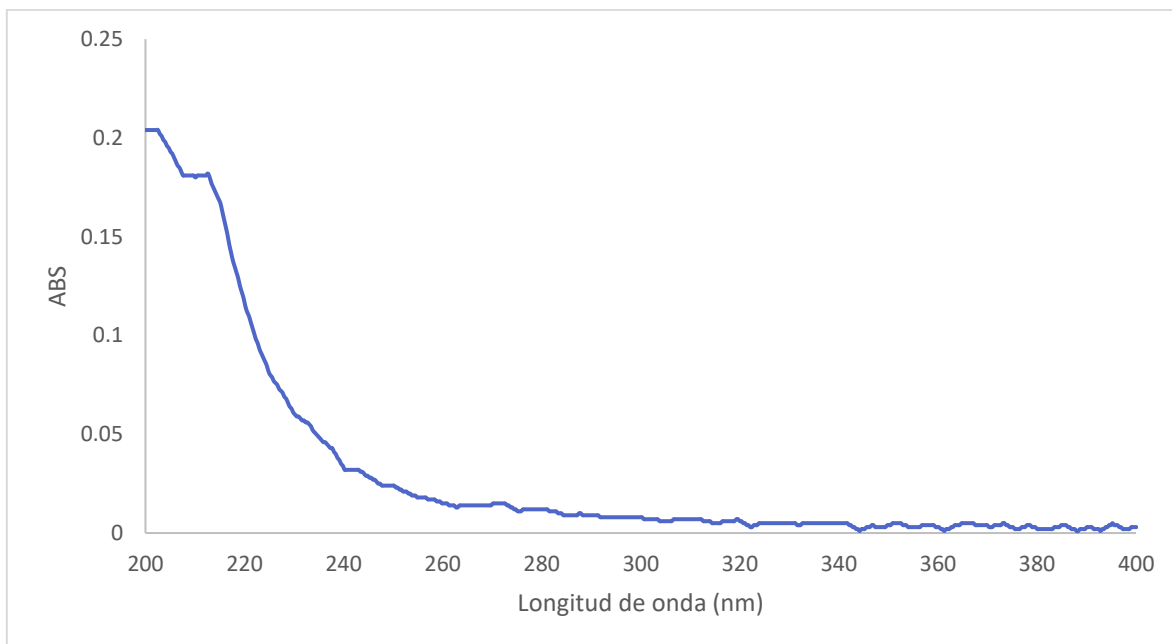
Tabla de características generales del Cremophor® EL

PARÁMETRO	VALOR
CAS	61791-12-6
Tipo de tensoactivo	No iónico
Peso molecular	172.00 g/mol
Fabricante	BASF
Nombre comercial	Cremophor® EL/Kolliphor® EL
Densidad a 25° C	1.054 g/mL
Color	Amarillo pálido translúcido
Olor	Ligero, característico
Índice de saponificación	60 – 75 (mg KOH/g)
Intervalo de pH	6.0-8.0
HLB	13

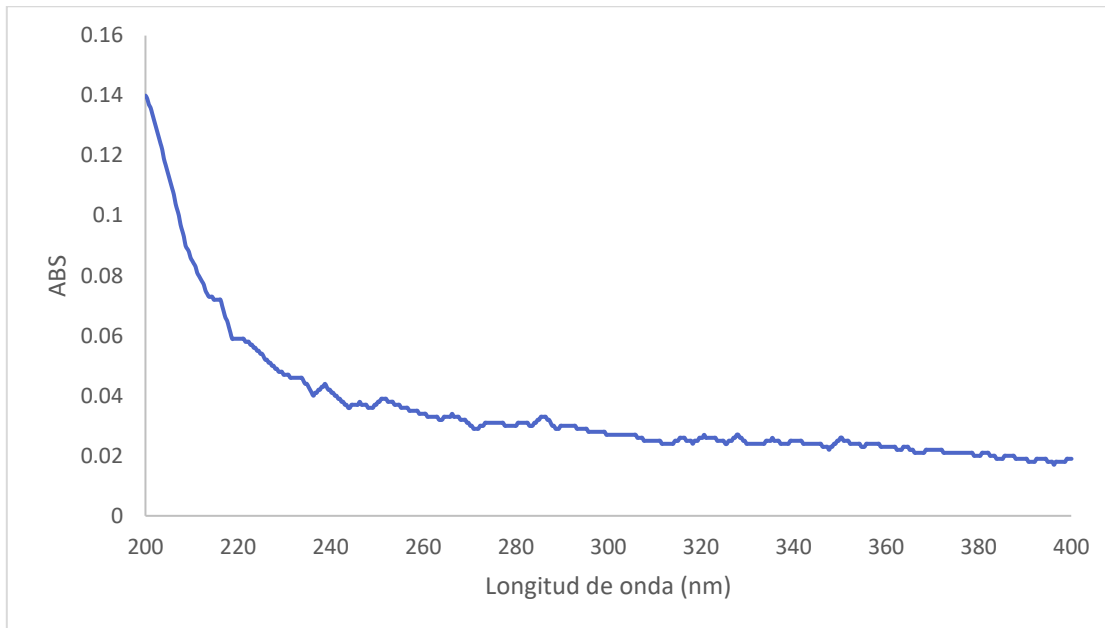
Adaptado de Sigma-Aldrich (2017) Kolliphor® EL (en línea). Disponible en:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5135?lang=es®ion=MX&gclid=EA1aIQobChMlzqmtmavX1glVRmx-Ch2b-gyFEAAAYASAAEgJUCvD_BwE>
[10 de Agosto de 2017].



Estructura del Cremophor® EL, ACD Chem Sketch



Espectro de absorción UV del Cremophor® EL en etanol. *Barrido de 200-400 nm*

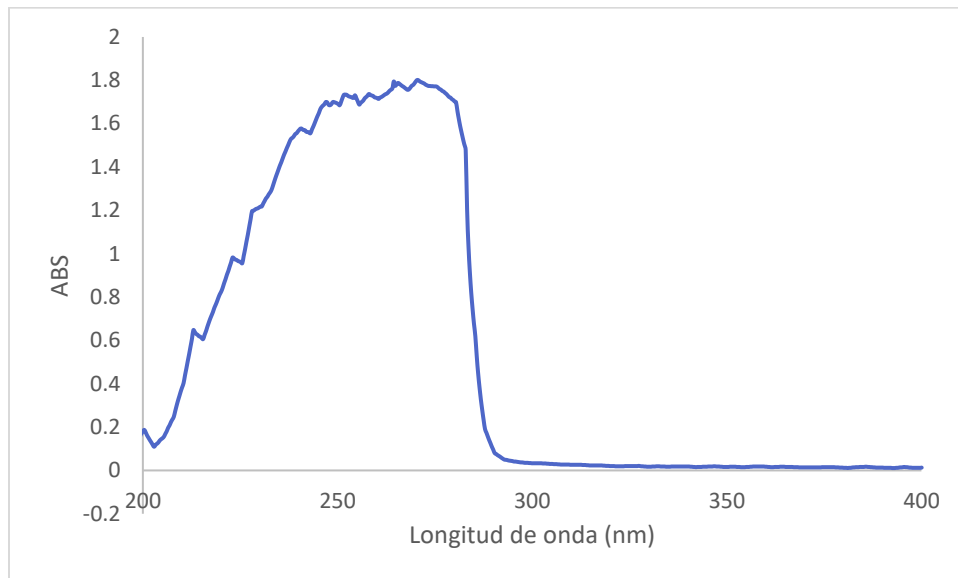


Espectro de absorción UV del Cremophor® EL en buffer de fosfatos. *Barrido de 200-400 nm.*

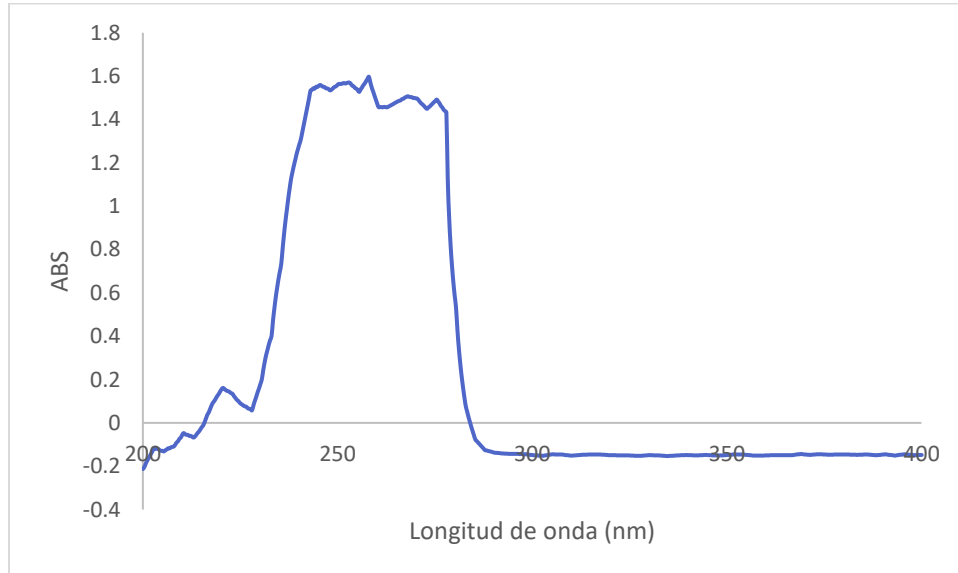


ANEXO 4

Espectros de absorción UV del ibuprofeno en los medios de trabajo



Espectro de absorción UV de ibuprofeno en etanol. Barrido de 200-400 nm



Espectro de absorción UV de ibuprofeno en buffer de fosfatos pH 7.5. Barrido de 200-400 nm





Feasibility of obtaining in situ nanocapsules through modified self-microemulsifying drug delivery systems. A new manufacturing approach for oral route administration

Viridiana Gisela Llera-Rojas, Alicia Del Real L., Néstor Mendoza-Muñoz, Luz María Melgoza-Contreras & David Quintanar-Guerrero

To cite this article: Viridiana Gisela Llera-Rojas, Alicia Del Real L., Néstor Mendoza-Muñoz, Luz María Melgoza-Contreras & David Quintanar-Guerrero (2017) Feasibility of obtaining in situ nanocapsules through modified self-microemulsifying drug delivery systems. A new manufacturing approach for oral route administration, Drug Development and Industrial Pharmacy, 43:6, 925-931, DOI: [10.1080/03639045.2017.1285308](https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1285308)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1285308>



Accepted author version posted online: 20 Jan 2017.
Published online: 08 Feb 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 132



View related articles [↗](#)




View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Feasibility of obtaining *in situ* nanocapsules through modified self-microemulsifying drug delivery systems. A new manufacturing approach for oral route administration

Viridiana Gisela Llera-Rojas^a, Alicia Del Real L.^b, Néstor Mendoza-Muñoz^c, Luz María Melgoza-Contreras^d and David Quintanar-Guerrero^a 

^aLaboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México; ^bDepartamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México; ^cLaboratorio de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Carr. Coquimatlán, Colima, México; ^dLaboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México

ABSTRACT

Nanocapsules (NCs) are submicron-sized core shell systems which present important advantages such as improvement of drug efficacy and bioavailability, prevention of drug degradation, and provision of controlled-release delivery. The available methods for NC production require expensive recovery and purification steps which compromised the morphology of NCs. Industrial applications of NCs have been avoided due to the aforementioned issues. In this study, we developed a new method based on a modified self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for *in situ* NCs production within the gastrointestinal tract. This new methodology does not require purification and recovery steps and can preserve the morphology and the functionality of NCs. The *in situ* formed NCs of Eudragit[®] RL PO were compared with nanospheres (NEs) in order to obtain evidence of their core-shell structure. NCs presented a spherical morphology with a size of 126.2 ± 13.1 nm, an ibuprofen encapsulation efficiency of 31.3% and a zeta-potential of 37.4 mV. Additionally, NC density and release profile (zero order) showed physical evidence of the feasibility of NCs *in situ* creation.

ARTICLE HISTORY

Received 19 September 2016
Revised 11 January 2017
Accepted 16 January 2017

KEYWORDS

Nanotechnology; SMEDDS; nanocapsules; nanospheres; *in situ*; new method

Introduction

Polymeric nanoparticles (NPs) can be defined as submicronic colloidal systems with an average size of ~ 100 – 500 nm¹. NPs are constructed through macromolecules assemblies into which the drug is dissolved, adsorbed or encapsulated in the external phase of the NPs².

The first NP's were made of gelatin and albumin, two natural peptides capable of stimulating immune responses. To avoid this, the use of synthetic polymers was preferred, a change that gave the nanoparticles a rigid structure and the ability to extend and control the release of many drugs^{3,4}. Also, nanoencapsulation improves drug efficacy and drug bioavailability, protects the drug from degradation and interaction with biological media, enhances absorption and retention time, and improves intracellular penetration^{5–9}. All these features can lower the overall systemic dose and damage that toxic or potent drugs would otherwise produce, thus increasing patient compliance and quality of life¹⁰.

Nanocapsules (NCs) are vesicular systems in which a drug is confined in a cavity consisting of an inner liquid core surrounded by a polymeric membrane¹. Nanospheres (NEs) have a matrix structure inside which the polymer is mixed with the drug⁹. NCs have several advantages over NEs: higher drug encapsulation efficiency because the oily core can solubilize high amounts of drug; a lower polymer content; and a polymeric membrane that provides protection against such degradation factors as pH and enzymes, among others¹¹. However, the structure of NCs is very

fragile, and there are few methods available for their preparation. The most common ones are nanoprecipitation, emulsion-diffusion, double emulsification, emulsion-coacervation, polymer coating and layer-by-layer¹².

But all these methods require recuperation, purification and stabilization steps that entail techniques such as diafiltration, gel filtration, ultracentrifugation, spray-drying and lyophilization;¹² all of which may increase production costs and cause the NCs to lose structure and functionality due to breakage, aggregation, leaking or instability, etc.^{13,14}. These disadvantages mean that developing methods for nanoparticle production is an important challenge for pharmaceutical producers.

Considering these aspects, the main goal of this study was to develop a method for *in situ* NC formation that eliminates the need for recuperation, purification and stabilization steps, but seeks to preserve the NC's morphology and functionality throughout its lifetime. Here, self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) offer many useful features. SMEDDS are mixtures of lipids, surfactants and cosurfactants known as "concentrated"¹⁵ that are easily emulsified by dilution in aqueous media under gentle agitation (similar to those found in the gastrointestinal tract) and provide a stable microemulsion with globules 100–250 nm in size¹⁶. These self-emulsification properties can be exploited to build NCs *in situ* if a suitable polymer is solubilized in the SMEDDS formulation (SMEDDS-polymer), where the microemulsion droplets work as a template for polymer precipitation and *in situ* NC formation under gastrointestinal tract conditions.

Numerous studies have established that it is possible to obtain SMEDDS formulations using chain triglycerides as the oily medium^{9,17}. Since the cosurfactant must have amphiphilic characteristics, some non-ionic surfactants and alcohols have been used for this purpose^{18–20}. Short-chain alcohols are often used because they reduce the surface tension of the system and increase flowability, which leads to an increase in entropy and, therefore, greater system stability^{20,21}. In this case, the characteristics of the cosurfactant are crucial since its function is to dissolve the polymer in the concentrate, but after dilution, the cosurfactant must diffuse into the aqueous medium, leading to polymer desolvation that allows it to be deposited on the surface of the oil droplet where it forms the rigid polymeric shell.

Materials and methods

Materials

Propylene Glycol Dicaprylate/Dicaprate (Captex[®] 355, Watson Phillips, Mexico), Polyoxyl 35 Castor Oil (Cremophor[®] EL, BASF), Ammonium Methacrylate Copolymer Type A/Type B – NF (Eudragit[®] RL PO) were generously donated by Helm de México, S.A. de C. V. Sucrose and Percoll[®] were obtained from Sigma (St. Louis, MO) and Density Marker Beads[®] from Pharmacia LK B (Sweden). Deionized water was obtained from the Elix 5[®] system (Millipore, Billerica, MA). All other chemicals were of at least analytical grade and used without further purification.

Design of the method

SMEDDS fabrication

Assays were performed to determine the adequate proportion of surfactant, cosurfactant and oil capable of providing a microemulsion with translucent/opalescent appearance and oil droplets with an average size of 100 nm. Triplicate samples of each concentrate were diluted to 1:50 with water pre-equilibrated at $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and gently mixed by a magnetic stirrer. The proportions studied were based on previous work by Elnagar, et al.²² and are summarized in Table 1.

SMEDDS formula selection

The globule size of each formulation was determined by the laser light scattering technique (Coulter N4 Plus; Beckman Coulter, Brea, CA). The laser light wavelength was 678 nm (He/Ne 10 mW). Measurements were obtained at 90° fixed-angle for 180 s at room temperature. All evaluations were performed without dilution and in triplicate for all batches prepared. Finally, batches with a

globule size of 80.0–120.0 nm were centrifuged at 15,000 rpm by 15 min. Samples showing phase separation were discarded from the study.

Polymer selection and incorporation

After formula selection, we searched for an adequate pharmaceutical polymer to form the NC shell. It needed to be soluble in the chosen cosurfactant and, at the same time, be water insoluble. An amount of 400 mg of Methyl methacrylate (Eudragit[®] RL PO), per 1 mL of oil was fixed to ensure encapsulation of the oil. This ratio was previously determined by our research group. The polymer was added to the concentrate and the resultant mixture was diluted to 1:50 with water pre-equilibrated at $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$, gently mixed by a magnetic stirrer.

Nanoparticle preparation and characterization

SMEDDS-polymer and nanoparticle fabrication

The SMEDDS-polymer preparation is described in Figure 1. For 5 mL of SMEDDS-polymer concentrate, 0.8 g of polymer were dispersed in 2 mL of oily phase at room temperature (25°C) with magnetic stirring until complete homogenization (around 30 min each one), then 1.5 mL of surfactant were incorporated and finally 1.5 mL of cosurfactant were added, at this point, the mixture was cover to avoid cosurfactant evaporation and stirred for another 30 min. This addition order was highly important because it allowed the dissolution of the polymer generating a stable mixture. Finally, for *in vitro* NCs formation, 2 mL of SMEDDS-polymer formula were added, drop by drop, to 50 mL of distilled water at 37°C with mild agitation.

In order to confirm the core-shell structure of the proposed NCs, we prepared NEs with a typical matrix structure to compare the characteristics of both systems, using the same process and eliminating the oil from the formula.

As the main goal of this study was to corroborate the NCs *in situ* formation, the low water soluble and well-characterized non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen was selected as a model drug for encapsulation. Ibuprofen was added in 1:2.5 oil ratio, considering ibuprofen solubility in captex (0.98 g/mL), as the core of the proposed NCs will be constituted for the oily phase.

Nanoparticle size and Z-potential The nanoparticle dispersion was diluted 50-fold with distilled water and size analysis was performed as described above (globule size analysis). Zeta-potential analyses were carried out using the nanoparticle dilutions in distilled water by the electrophoretic light scattering technique (Nano ZS90, Malvern, UK) using a He-Ne 633 nm laser. Measurements were performed in triplicate at room temperature.

Nanoparticle density determination Density was evaluated by isopycnic separation using a colloidal silica gradient. NCs containing an oil/tensoactive/cotensoactive polymer and NEs containing a tensoactive/cotensoactive polymer were concentrated by centrifugation (3000 rpm for 3 h at 5°C), then 500 μL of the concentrated dispersions were added to 7 mL of Percoll[®] 45% (v/v) diluted with 0.15 M NaCl. The gradient was generated *in situ* by ultracentrifugation at 6128g at 5°C for 3 h in a 25° angle head rotor (90Ti, Beckman Coulter, Brea, CA). Density marker beads were treated in the same way. At the end of the test, the samples' band positions were compared to the marker beads' position²³.

Table 1. Mixture composition for formula testing and selection.

Sample	Mixture composition			Sample	Mixture composition		
	%Oil	%ST ^a	%CST ^b		%Oil	%ST ^a	%CST ^b
01	30	70	0	11	25	60	15
02	30	60	10	12	25	50	25
03	30	50	20	13	25	40	35
04	30	40	30	14	20	60	20
05	40	60	0	15	20	50	30
06	40	50	10	16	20	40	40
07	40	40	20	17	15	40	45
08	40	30	30	18	17	40	43
09	50	50	0	19	15	50	35
10	50	40	10	20	17	50	33

^aST: surfactant.

^bCST: cosurfactant.

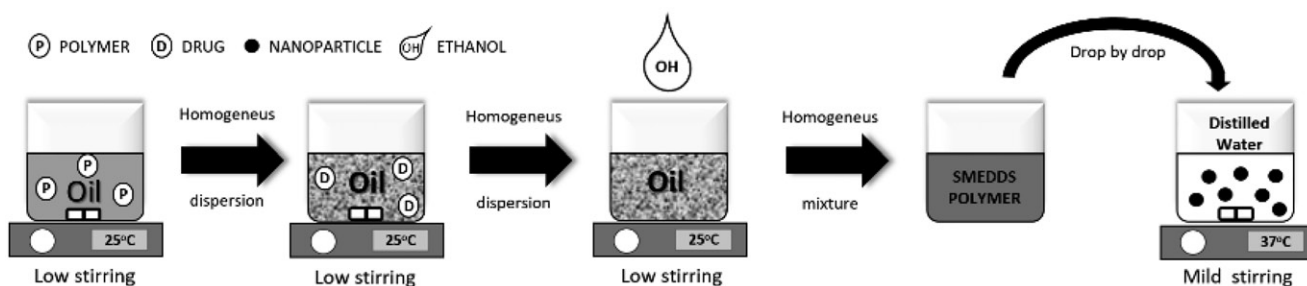


Figure 1. Nanocapsule and nanosphere preparation. In the nanosphere preparation, oil is not added to the concentrate.

Experimental drug payload

The nanoparticles were concentrated by centrifugation (30,000 rpm, 5 °C, 3 h) and the sediment obtained was washed with 10 mL of deionized water and dried for 24 h at room temperature. Drug-loading was determined by spectrophotometry at 265 nm after dissolving the dried material in ethanol (10 mL). Quantification was achieved by comparing the absorbance of 265 nm of ibuprofen sample to a calibration curve ($R^2 = .9995$). Drug payload (%) was determined by:

$$\text{Drug payload (\%)} = \frac{\text{Experimental drug payload}}{\text{Ibuprofen}_{\text{initial}}} \times 100$$

where, experimental drug payload is the quantified drug in the dried material and $\text{Ibuprofen}_{\text{initial}}$ is the quantity of drug used for nanoparticle preparation.

Nanocapsule scanning electronic microscopy (SEM)

Each NC dispersion was spread over a slab and dried at room temperature. Samples were coated with a thick layer of gold (~20 nm) (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japan) and analyzed by SEM using a JSM-25 S II scanning electron microscope (JEOL, Japan).

In vitro drug release

This test consisted in placing dialysis tubes (cellulose membrane MCWO 18000, Sigma Aldrich) containing 25 mL of fresh, homogeneous nanoparticle suspension, equivalent to 50 mg of ibuprofen. Each tube was tied to a basket shaft of a USP dissolution apparatus I and placed in beakers with 400 mL of potassium phosphate buffer (pH 7.5). The beakers were placed in a water bath at 37 °C, stirred at 75 rpm, and 3 mL samples were collected without replacement at 30, 60, 90 and 120 min, and then each hour up to the 10th hour. Ibuprofen quantification was carried out by spectrophotometry at 221 nm by comparing the absorbance of the ibuprofen samples to a calibration curve ($R^2 = .9997$).

The free ibuprofen release profile was tested under the same conditions, using 50 mg of the drug, and taking samples at 20, 40, 60, 90 and 120 min.

Results

Design of the method

SMEDDS formula selection

The excipients selected were Cremophor[®] EL as the surfactant, Captex[®] 355 as the oily phase and ethanol as the cosurfactant due to its polymer-dissolving capacity. These components are safe for pharmaceutical use and can provide stable SMEDDS. In particular,

the use of Cremophor in SMEDDS[®] has been widely documented^{24,25}.

For formula selection, different mixtures were tested (Table 1). Formulations 13, 14 and 16–20 had a typical microemulsion appearance¹⁵, so their particle size was determined. The other samples showed a conventional emulsion behavior¹⁵. Formulations 17–20 presented particle sizes less than 20 nm due to the high surfactant concentrations (50–60%) and low amount of oil (15–17%), which led to the formation of micelles. Under these conditions, the surfactant does not have a sufficient amount of oil to form a microemulsion. For their characteristics, formula 14 (94.7 ± 11.5 nm, polydispersity index (PI) 0.949) and formula 16 (121.9 ± 4.1 nm, PI 0.306) were subjected to centrifugation as stability test. As none of the samples presented phase separation, both were selected to continue the study.

Polymer selection and incorporation

Methyl methacrylate (Eudragit[®] RL PO), a copolymer of ethyl acrylate, was selected as the shell polymer because of its water insolubility and high solubility in ethanol (>800 mg/mL). This polymer was easily incorporated into formulations 14 and 16, forming an isotropic mixture. After dilution of sample 14, the polymer precipitated in large agglomerates. In contrast, batch 16 showed the translucent appearance common in colloidal dispersions. This result allowed us to determine the likely presence of nanoparticles in this formulation. Therefore, this formula was selected for nanoparticle characterization.

Nanoparticle characterization

The properties of the NCs and NEs are summarized in Table 2. The results of the size and density studies showed an important difference between the NCs and NEs.

Nanocapsule scanning electronic microscopy (SEM)

The SEM study of batch 16 showed submicronic particles with a spherical morphology and a smooth surface; results that constitute important evidence of the formation of nanoparticles (Figure 2).

However, this technique did not allow us to observe the internal cavity of the nanoparticles so obtained; thus, it was necessary to perform additional studies in order to confirm, albeit indirectly, the core-shell structure of the NCs.

In vitro drug release

Figure 3 shows the ibuprofen release profiles from free ibuprofen, NCs and NEs. In general, the drug release profiles from nanoparticles depend on the nature of the delivery system, so, in order to identify the release mechanism of the nanoparticles obtained, zero

and first-order models were tested on the basis of the nanoparticle release data. Both models are widely used to identify drug release mechanisms from nanoparticles³.

Discussion

Important difference between the NCs and NEs properties can be seen in Table 2, these results can be attributed to the specific structural characteristics of the NCs (core-shell structure) and NEs (matrix structure). The generation of both systems can be

Table 2. Nanocapsule and nanosphere properties.

System	Mean diameter (nm \pm σ) ^a	Density (g/mL) ^c	Drug payload (%) ^d	%Ibp/NP ^d	Z ^e
Nanocapsule	126.2 \pm 13.1 PI ^b 0.428	1.03	31.3	62.4	37.4 mV
Nanosphere	87.4 \pm 25.2 PI ^b 0.600	1.11	33.9	38.9	33.9 mV

PI: polydispersity index.

^a σ standard deviation from three measurements ($n=3$).

^bCoefficient of variation of the distribution = $1/p[(1/2 \times PI) + 4]$.

^cDetermined in a colloidal silica gradient.

^dCalculated as the ibuprofen proportion in the dried mass of nanoparticles.

^eZeta-potential measured at room temperature in deionized water at pH = 7.

explained on the basis of the mechanism of the formation of microemulsions from SMEDDS.

The spontaneity of the microemulsion formation is the result of a state of non-equilibrium between two liquids; so the spontaneous emulsification process increases the entropy and decreases the Gibbs free energy of the system, stabilizing it²⁶. This theoretical mechanism was proposed by Miller and Ruschak, and has been widely confirmed²⁷. The formation of the NCs can be explained by the polymer solubility in the cotensoactive formulation. In the oil/tensoactive/cotensoactive mixture, the ethanol (cotensoactive) can solubilize the polymer, but by adding the formula to an aqueous media, such as a biological fluid into gastrointestinal tract, the ethanol diffuses into the water, thus stabilizing the microemulsion and desolvating the polymer at the o/w interface. After that, the polymer takes the mold provided by the microemulsion, encapsulating the oil and forming the NC²⁷. This mechanism is described in Figure 4, which considers oral administration of the formula.

Regarding the density parameter, NCs contain oil globules as their core material, which is less dense than water (0.94 g/mL, 25 °C). Therefore, they tend to have low-density values (1.03 g/mL, Figure 5). Also, the oil droplets may fuse before polymer precipitation, producing larger particles (126.2 \pm 13.1 nm).

NEs, in contrast, do not contain an oil, so cluster formation depends only on the rate of agitation and the stability provided

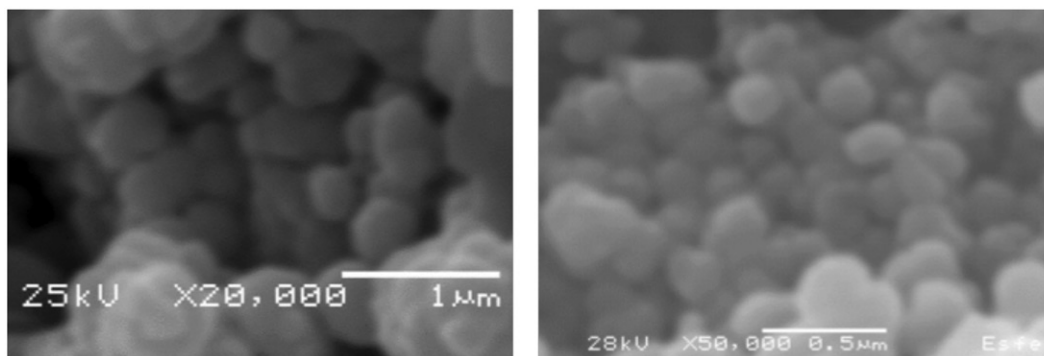


Figure 2. SEM images of nanocapsules obtained *in situ*.

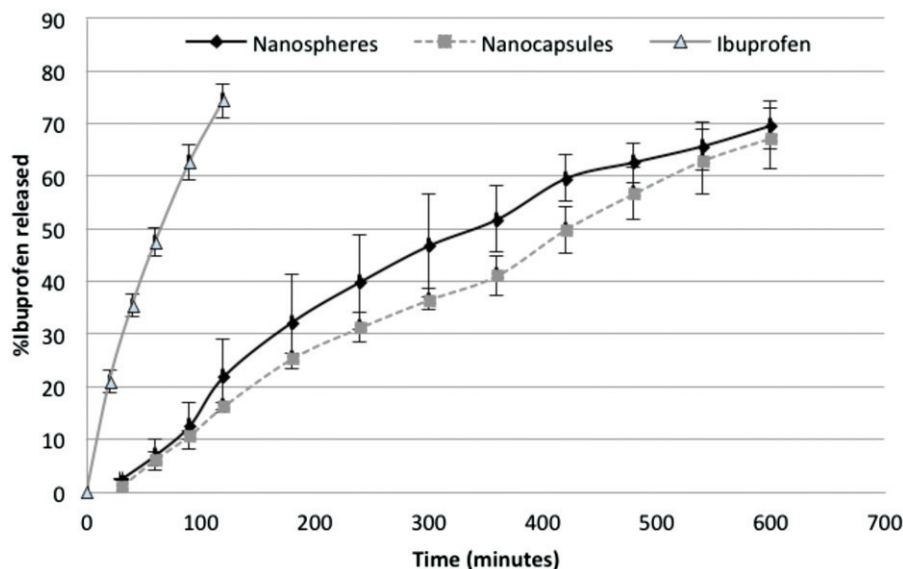


Figure 3. Ibuprofen release from nanocapsules and nanospheres.

The duration of the study was 10 h, $n=4$, error bars represent the standard deviation from the mean.

by the tensoactive element, which leads to the formation of smaller (87.4 ± 25.2 nm), denser structures (1.11 g/mL, Figure 5).

Upon analyzing the drug payload of NCs and NEs, we found that they had similar capacities, 31.3% and 33.9% (Table 2). But, if we relate the amount of drug contained in the dry mass of nanoparticles, 62.4% of NCs' dried weight corresponded to ibuprofen, and the remaining 37.6% was made up of the oil and polymer; while in the NEs, 38.9% of the dried weight corresponded to ibuprofen and the remaining 61.1% consisted only of the polymer. These findings correlate with those reviewed previously by

Couvrier, who showed that NCs have a higher encapsulation efficiency and lower polymer content⁹.

The zeta-potential of nanoparticles depends primarily on the chemical nature of the polymer and stabilizing agent, as well as the pH of the medium¹². The zeta-potentials of the nanoparticles obtained in this study are shown in Table 2. These values are similar for the NCs and NEs because the outer layer of both systems is constituted by the same polymer, the only difference is the oil present inside the NCs, which apparently does not contribute to zeta-potential. Zeta-potential values below -10 mV allow a prediction of good colloidal stability due to the high-energy barrier that exists between particles¹².

Figure 3 shows the release profiles of the studied systems. Despite the dialysis membrane could retain the drug (75% is released in 2 h) there was a remarkable difference between the release of free ibuprofen and the nanoparticles, which can only be due to their internal structure. It is important to denote, that nanoparticles release profile do not show a different behavior which could lead to detect the release of free drug, an important parameter considering the *in situ* formation, and further testing will be needed.

In order to identify the release mechanism of the nanostructures, the basic zero and first kinetic models were applied to both systems. The ibuprofen release shows NC release profile adjusted to the zero-order model ($R^2 = .9950$) a result that coincides with previous observations by Calvo et al. In the NCs (reservoir-type drug-delivery systems), the drug core is coated with the polymer and release occurs by diffusion of the drug from the core across the polymeric barrier layer. Hence, theoretically at least, drug release should follow zero kinetics²⁸.

The NEs release profile adjusted to a first-order model ($R^2 = .9595$). In the case of the matrix device, the drug is uniformly distributed/dissolved in the matrix and release occurs by diffusion or erosion of the matrix²⁹. For this reason, release in NEs (matrix structure) follows first-order kinetics^{30,31}.

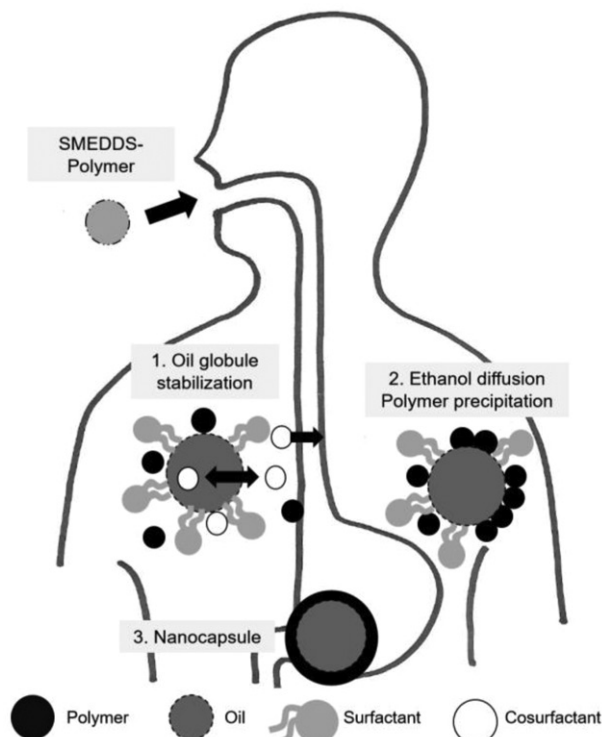


Figure 4. Proposed mechanism for nanocapsule formation. Concentrate-polymer mixture can be administrated by oral route. In contact with the gastric fluid and gentle agitation provided by peristalsis, microemulsion globules are formed. Subsequently, the ethanol diffuses leading to polymer precipitation and nanocapsule formation.

Conclusions

This study shows the feasibility of obtaining NCs *in situ* from a modified SMEEDS-polymer formulation through a simple process

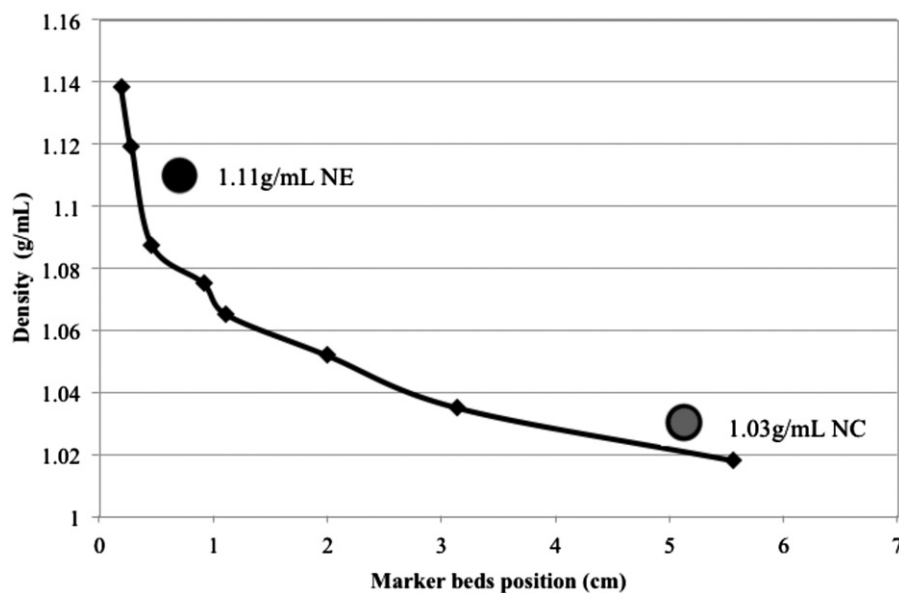


Figure 5. Nanoparticle density.

that does not require the use of organic solvents or entail costly purification steps. These NCs can be manufactured with equipment normally available in any liquid manufacturing area and require little energy and short manufacturing periods.

The NCs obtained are stable in colloidal dispersion, as zeta-potential showed, and have a spherical morphology. Their density and *in vitro* profile release allow us to confirm their core shell structure.

In addition, the formulation employed can improve the solubility of various active ingredients, function as a permeation enhancer for their contents of surfactants and cosurfactants, protect the drug from a degradative environment, ensure the stability of heat-sensitive drugs and control the release rate and site by selecting the appropriate polymer. The formula can also be adapted to different active ingredients with distinct physicochemical characteristics by adjusting its composition.

Finally, although the system has shown the feasibility of NC *in situ* production, additional testing is needed in two important aspects: first, the concentrate stability, essential for determining the shelf life of the product. And second, the improvement of release test evaluating the impact of free drug in the release profile.

Acknowledgments

This work was supported by the UNAM under Grant PAPIIT IT201914; CONACYT under Grant CB-221629 and grant 227113.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the UNAM under Grant PAPIIT IT201914; CONACYT under Grant CB-221629 and grant 227113.

ORCID

David Quintanar-Guerrero  <http://orcid.org/0000-0002-0881-0943>

References

- Quintanar D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:1113–28.
- Kreuter J. Nanoparticles. Colloidal drug delivery systems, drugs and the pharmaceutical sciences. Chapter 5, Vol. 66. New York: Marcel Dekker; 1994.
- Kumares S, Tejraj M, Anand Rao K, Walter R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001;70:1–20.
- Fattal E. Nanoparticles as drug delivery systems. In: Wise DL, ed. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. New York: CRC Press; 2000:1864–67.
- Schroeder U, Sommerfeld P, Ulrich S, Sabel BA. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 1998;87:1305–7.
- Raghuvanshi RS, Katore YK, Lalwani K, et al. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int J Pharm* 2002;245:109–21.
- Kreuter J, Petrov VE, Kharkevich DA, Alyautdin RN. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J Control Release* 1997;49:81.
- Faraji HA, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 2009;17:2950–62.
- Couvreur P, Barrat G, Fattal E, et al. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002;19:99–134.
- Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006;307:93–102.
- Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *J Control Release* 2008;128:185–99.
- Mora Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113–42.
- Duclairoir C, Nakache E, Marchais H, Orecchioni AM. Formation of gliadin nanoparticles: influence of the solubility parameter of the protein solvent. *Colloid Polym Sci* 1988;276:321–7.
- Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* 2008;26:1025–58.
- Lawrence MJ, Rees DG. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;45:89–121.
- Kohli K, Chopra S, Dhar D, et al. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today* 2010;15:958–65.
- Pouton CW. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;25:47–58.
- Sagitani H, Friberg S. Microemulsion systems with a non ionic surfactant. *J Disper Sci Technol* 1980;1:151–64.
- Osborne DW, Middleton CA, Rogers RL. Alcohol-free microemulsions. *J Disper Sci Technol* 1988;9:415–23.
- Attwood D, Mallon C, Taylor CJ. Phase studies of oil-in water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm* 1992;84:R5–8.
- Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999;16:461–521.
- Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. “Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: design and optimization”. *Int J Pharm* 2009;380:133–41.
- Mendoza-Muñoz N, Noriega-Peláez EK, Nava-Arzaluz MG, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging. *Ultrasonics* 2011;51:839–45.
- Rao RVS, Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs: I. Formulation development. *Int J Pharm* 2008;362:2–9.
- Liu Y, Zhang P, Feng N, et al. Optimization and *in situ* intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm* 2009;365:136–42.
- Ruschak KJ, Miller CA. Spontaneous emulsification in ternary systems with mass transfer. *Ind Ing Chem Fundam* 1972;11:534–40.
- Fessi HP, Devissaguet JP, Puisieux F, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;55:25–8.

28. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions as ocular drug carriers. *J Pharm Sci* 1996;85:530–6.
29. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, et al. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug behavior. *J Control Rel* 1993;25:89–98.
30. Fresta M, Puglisi G, Giammona G, et al. Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J Pharm Sci* 1995; 84:895–901.
31. Radwan MA. In vitro evaluation of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles as a controlled drug carrier for theophylline. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21:2371–5.